Aus dem C. und O. Vogt - Institut für Hirnforschung der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

Fluorochromierungsmethode zur morphometrischen und stereologischen Auswertung von Hirnschnitten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Rainald Schmidt-Kastner
und
Hans-Bernd Tefett

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0011

Aus dem C. und O. Vogt - Institut für Hirnforschung der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

Fluorochromierungsmethode zur morphometrischen und stereologischen Auswertung von Hirnschnitten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rainald Schmidt-Kastner

und

Hans-Bernd Tefett

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.Brüster

Referent
gez.: Prof.Dr.Mai

Korreferent
gez.: Prof.Dr.Dr.Pfitzer

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG		6
MATERIAL UND METHODEN		17
1.	Gewebepräparation	17
2.	Histologische Verfahren	17
2.1	Acridin-Orange (AO)	17
2.2	Nuklealreaktion nach Feulgen	20
2.3	Nissl-Methode mit Cresyl-Violett (CV)	21
2.4	Autoradiographie	21
2.5	Kombination der AO-Färbung am Schnittpräparat mit anderen histologischen Verfahren	21
2.5.1	Zusätzliche Fluoreszenzfärbung	21
2.5.2	Routineverfahren	22
2.5.3	Autoradiographie	22
2.5.4	Immunperoxydase-Verfahren	22
3.	Mikroskopische Ausrüstung	22
3.1	Auflichtfluoreszenz-Einrichtung	22
3.2	Mikroskopphotometer	24
3.3	"Scanning"-Verfahren	24
3.4	Datenverarbeitung	26
4.	Photometrische Analyse	26
4.1	Zytophotometrie	26
4.1.1	Kontrast-Definition	27
4.1.2	Spezielle Fluoreszenzanalyse	30
4.2	Histophotometrie	30
4.3	Morphometrie	31
4.4	Stereologische Darstellung	32
4.5	Autoradiographie	32
5.	Grauwertmessung	32
ERGEBNISSE		34
1.	Färbeergebnisse	34
1.1	AO	34

1.1.1	Histologisches Bild	34
1.1.2	Spezielle Fluoreszenzanalyse	35
1.1.3	Ausbleichverhalten	38
1.2	Nuklealreaktion nach Feulgen	39
2.	Zytophotometrie	39
2.1	AO	39
2.2	Vergleich von Kontrasten nach unterschiedlichen Färbungen	42
3.	Histophotometrie	44
3.1	AO	44
3.1.1	Morphometrie	44
3.1.1.1	Meßwertverteilungen und Auswahl der Isolinien	44
3.1.1.2	Darstellung der ASC mit Isolinien	47
3.1.1.3	Morphometrische Befunde des SCN	54
3.1.2	Kombination der AO-Färbung mit anderen histologischen Verfahren	55
3.1.3	Stereologische Darstellung der ASC	56
3.2	CV	59
3.2.1	Morphometrie	59
3.2.1.1	Meßwertverteilungen und Auswahl der Isolinien	59
3.2.1.2	Darstellung der ASC mit Isolinien	59
3.2.1.3	Morphometrische Befunde des SCN	62
3.2.2	Kombinierbarkeit der CV-Färbung mit anderen histologischen Verfahren	62
3.2.3	Rekonstruktion der ASC unter Integration autoradiographischer Befunde	62
4.	Grauwertmessung	66
DISKUSSION		69
1.	Präparation und Färbung	70
2.	Fünf Kriterien	74
	Konstanz und Reproduzierbarkeit	75
	Spezifität	76
	Kontrast	77
	Kombinierbarkeit	78
3.	Instrumentelle Bedingungen	81

4. Morphometrie und Stereologie 81

Grundlagen 81
Morphometrische Befunde und stereologische Darstellungen in der ASC 83

5. Ausblick 90

ZUSAMMENFASSUNG 91

LITERATUR 94

Einleitung

Bei der extremen Fragmentierung histologischer und histochemischer Befunde, sogar bei der Analyse einer einzigen Spezies, ist es überraschend, daß sich neuroanatomische Untersuchungen fast ausnahmslos auf eine subjektive Beurteilung des Materials stützen. Einen Ansatz zu einer objektiven Auswertung stellen messende Verfahren wie morphometrische Zählmethoden oder photometrische Datenerhebungen dar. Diese quantitativen Befunde der Morphometrie beruhen auf einer großen Zahl von Einzeldaten, die sich aber in aller Regel auf einen Parameter (z.B. Zytoarchitektonik) beschränken. Für die angestrebte objektive Beurteilung, am besten mit Hilfe automatischer Methoden, liegt es nahe, objektive Bilder verschiedener Architektoniken zu einem gemeinsamen Bild zusammenzufassen, das nicht nur eine Abgrenzung der einzelnen Strukturen, sondern auch eine Korrelation der Befunde untereinander erlaubt. Da nach C. u. O. VOGT (1928) die Analyse der verschiedenen Architektoniken zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Grenzziehung zwischen histologischen Strukturen führt, ist für eine richtige Abgrenzung das "Zusammenarbeiten aller Formen der Architektonik" (C. u. O. VOGT) notwendig. Erst ein solches integrierendes Modell erlaubt es, funktionelle Zusammenhänge zu erkennen. Ein vollkommenes Bild dieser komplizierten architektonischen Strukturen ließe sich durch Anwendung stereologischer Methoden erreichen (HAUG, 1972), da hiermit aus den zweidimensionalen Schnittbildern die räumliche Beschaffenheit rekonstruiert werden kann (FISCHMEISTER, 1967). Dieses Ziel ist nur durch eine computergestützte dreidimensionale Befundrekonstruktion zu verwirklichen (TECKHAUS, LÜBBERS und RAGER, 1979).

Bisherige färberische Verfahren können diese Ziele vor allem deshalb nicht erfüllen, weil zum einen die erreichbaren Kontraste für eine automatische Auswertung zu gering sind oder

weil zum anderen Zweitfärbungen des selben Präparates entweder unmöglich sind oder doch zumindest deren automatische Auswertung auf kaum zu überwindende Schwierigkeiten stößt. Das Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Entwicklung und routinemäßigen Anwendung einer Zellfärbung, die diese Limitierungen überwindet.

Bei der visuellen Auswertung soll das zytoarchitektonische Bild eine gute Interpretierbarkeit der zellulären Elemente seitens des Untersuchers garantieren, der sich aus naheliegenden Gründen am klassischen "Nissl-Bild" orientiert. Bei einer automatischen und quantifizierenden Auswertung müssen an die Färbung weitere Anforderungen gestellt werden. Es sind dies wie von EINS und GALLYAS (1977), MATZKE, THIESSEN und TIFFE (1979), SCHIPPER, TILDERS und PLOEM (1978) sowie SCHWALBACH (1975) gefordert:

1. Konstanz der Färbung innerhalb eines Schnittes und durch eine Serie,
2. Reproduzierbarkeit von Färbeansatz zu Färbeansatz,
3. Spezifität der Färbung und
4. möglichst hohe Kontraste.

Da die zytoarchitektonische automatische Analyse um faseranatomische, angioarchitektonische und histochemische Befunde erweitert werden soll, ergibt sich für eine Analyse komplexer Verhältnisse ein zusätzliches Kriterium:

5. Kombinierbarkeit der Färbung mit anderen histologischen Methoden am selben Schnitt.

Auf der Suche nach einer geeigneten Färbemethode liegt es nahe, zuerst einmal die herkömmlichen Verfahren zur Darstellung der Zytoarchitektonik am Hirnschnitt zu betrachten. Das Standardverfahren stellt die Nissl-Methode mit ihren diversen Variationen (Cresyl-Violett (CV), Toluidinblau, Thionin) dar (C. u. O. VOGT, 1928; ROMEIS, 1968; KUHLENBECK, 1970). Das nach der Nissl-Färbung entstandene "Nervenzell-

äquivalentbild" (NISSL, zitiert nach KUHLENBECK, 1970) wurde von vielen Untersuchern zur quantitativen wie auch automatischen Auswertung herangezogen. Zur Erhebung der Meßwerte bedienten sich dabei CAMPBELL (1954) und RYZEN (1956) mikrophotometrischer Methoden, wohingegen ADHAMI (1973) und ZILLES (1978) die Grauwert-Analyse mit Video-Systemen verwandten.

Legt man die oben gegebenen Kriterien an, so ergibt sich für die Eignung der Nissl-Methode in einer automatischen Auswertung folgendes: Es entspricht der allgemeinen Erfahrung, daß die Färbeergebnisse der Nissl-Techniken relativ große, teilweise schon mit dem bloßen Auge erkennbare Unterschiede in der Tingierung und Farbintensität zeigen. So wies ADHAMI (1973) darauf hin, daß nach eingehender mikroskopischer Kontrolle nur Schnitte mit gleicher Farbintensität zur Messung kamen, so daß ein Teil verworfen werden mußte. Es zeigt sich demnach, daß die Kriterien der Konstanz (1) und Reproduzierbarkeit (2) nur in gewissen Grenzen erfüllt werden. Zur Spezifität (3) ist bekannt, daß sich regelmäßig die nukleinsäurehaltigen Zellstrukturen der verschiedenen Nervenzellen, Glia-, Ependym- und Endothelkerne anfärben, ohne daß der genaue Reaktionsmechanismus hinreichend geklärt ist (KUHLENBECK, 1970; KIERNAN und BERRY, 1975). Aufgrund der relativ hohen Kontraste (4) erlaubt das Nissl-Bild eine automatische Auswertung der Zytoarchitektonik. Das Kriterium der Kombinierbarkeit (5) ist aber schwer zu erfüllen, weil sich der angelagerte Farbstoff nicht ohne gröbere Eingriffe entfernen läßt. Eine nachfolgende Färbung, z.B. mit Luxol-Fast-Blue zur Darstellung der Markscheiden, wäre in dem kontrastreichen Nissl-Bild nicht automatisch zu differenzieren. Durch Wahl geeigneter Techniken, beispielsweise der Dunkelfeld-Beleuchtung von Silberkörnern im autoradiographischen Schnitt, käme der Nissl-Kontrast aus optischen Gründen nicht zur Darstellung, eine zweite automatische Analyse wäre demnach möglich.

In den angelsächsischen Ländern wird teilweise als Nissl-Methode die Färbung mit Gallocyanin-Chromalaun nach Einarson angewandt (ROMEIS, 1968). Diese Färbemethode ist leicht ausführbar und wird daher zur Färbung großer Schnittserien empfohlen (ROMEIS, 1968; GABE, 1976). Gallocyanin-Chromalaun stellt DNS- und RNS-haltige Zellelemente dar. SANDRITTER, KIEFER und RICK (1963) diskutierten eine stöchiometrische Beziehung zwischen der Menge des angelagerten Farbstoffes und dem Nukleinsäuregehalt. Nach neueren Erkenntnissen kann dieser Farbstoff nicht mehr als histochemischer Nachweis für Nukleinsäuren angesehen werden; dennoch ist hinsichtlich der Spezifität eine Überlegenheit anderen Farbstoffen gegenüber festzustellen (GABE, 1976), die für photometrische Untersuchungen am Schnittpräparat genutzt wurde (RYZEN, 1956).

Da eigene Voruntersuchungen keinen gesteigerten, eher einen reduzierten Kontrast gegenüber dem Nissl-Bild mit CV zeigten und sich auch hier, ebenso wie bei anderen Nissl-Farbstoffen, das Problem der Kombinierbarkeit stellt, ist der Vorteil für eine automatische Auswertung unerheblich.

Die Golgi-Methode gibt durch Anlagerung von Silberpräzipitaten ein Bild der gesamten Zelle und ihrer Ausläufer.

Diese Methode ist in ihren Resultaten unberechenbar, da sich nur ein Teil der Nervenzellen darstellt (KUHLENBECK, 1970). SMIT und COLON (1969) gaben in einer Grundlagen-Studie zur "Aselektivität" der Golgi-Cox-Methode an, daß der Anteil der dargestellten Nervenzellen ca. 1% betrug, sahen aber darin nach eingehenden statistischen Untersuchungen im Vergleich mit der Nissl-Methode eine adäquate Methode zur Auswertung im Cortex. Ein Verfahren der Reflektions-Photometrie am Golgi-Cox-Präparat gibt MANNEN (1966) an, bei dem es zur automatischen Darstellung von Konturlinien einzelner Zellen kam. EINS und GALLYAS (1977) beschrieben eine Silberimprägnation mit physikalischer Entwicklung, die die Kriterien (1)

bis (4) erfüllen soll, und von ihnen zur automatischen Auswertung von Hirnschnittarealen angewandt wurde. Trotz aller methodischen Verbesserungen der Golgi-Färbung kann diese weder am Routinepräparat noch an allen Hirnstrukturen durchgeführt werden.
Bei den bisher erörterten Färbemethoden sind die physikalisch-chemischen Ursachen der differenten Anfärbung weitgehend unbekannt. Diese Färbungen liefern ein differenziertes zytoarchitektonisches Bild und besitzen daher einen hohen histologischen Wert, eignen sich jedoch nicht für eine histochemische Charakterisierung.
Wählt man statt der Absorptions- die Fluoreszenzmikroskopie, so findet sich eine größere Zahl histochemischer Methoden, insbesondere zur Darstellung der Nukleinsäuren. Hier soll die prinzipielle Brauchbarkeit dieser Methoden für die Darstellung der Zytoarchitektonik erörtert werden. Das der Fluoreszenz zugrunde liegende physikalische Phänomen ist ein optischer Vorgang, bei dem Licht von einer Substanz, z.B. von einem an eine Nukleinsäure angelagerten Fluoreszensfarbstoff, absorbiert und umgehend als Licht höherer Wellenlänge emittiert wird. Bei entsprechender Anregung können so selbst sehr kleine Farbstoffmengen im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (PEARSE, 1972). Wenn man die notwendigen Minimalkonzentrationen der Farbstoffe im lichtmikroskopischen System und im Fluoreszenzsystem vergleicht, so stellt sich heraus, daß das Fluoreszenzsystem um einen Faktor von ungefähr 10^4 empfindlicher ist (BÖHM, 1972).

Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung der Nukleinsäuren finden eine breite Anwendung in der Zytophotometrie bei biologischen und pathologischen Fragestellungen (Zytofluorometrie). Dafür werden bevorzugt die verschiedenen Färbungen nach der Feulgen-Methode herangezogen. Das histochemische Prinzip dieser Methode besteht in der Reaktion

eines Schiffschen-Reagens mit den Carbonylgruppen der DNS, die sich nach vorangehender Säurehydrolyse ausgebildet haben (GABE, 1976). Als Schiffsches-Reagens dienen verschiedene Farbstoffe, von denen KASTEN (1959) eine größere Zahl charakterisiert hat. Die für die Fluoreszenzmikroskopie relevanten Farbstoffe finden sich bei BÖHM (1972). Standard-Farbstoff ist das Pararosanilin in der Aufbereitung nach GRAUMANN (1953). RUCH (1966) empfiehlt den Farbstoff BAO (2,5-bis-4'-amino-phenyl-(1')-1,3,4-oxdiazole), der besonders stabil unter UV-Anregung sein soll.

Die fluoreszenzmikroskopischen Feulgen-Methoden gelten als DNS-spezifisch (RUCH, 1970; BÖHM, 1972). Da sich der Farbstoff in einem stöchiometrischen Verhältnis an die DNS bindet, läßt sich aus der gemessenen Fluoreszenzmenge auf den DNS-Gehalt der untersuchten Struktur schließen. Somit ergibt sich eine hohe Spezifität (3). Aus der hohen Spezifität ließe sich eine hohe Reproduzierbarkeit (2) ableiten. Jedoch berichten MATZKE et al. (1979) Schwankungen der Meßwerte in Feulgen-Präparaten von bis zu 30%. Zudem gilt die Feulgen-Reaktion als färbetechnisch schwieriges Verfahren.

Das Färbeergebnis wird, wie bei allen Fluoreszenzmethoden, durch das Ausbleichverhalten beeinflußt, da sich die Fluoreszenz als Funktion der Zeit ändert. Dieses Problem, das die Konstanz (1) des Färbeergebnisses erheblich beeinträchtigt, läßt sich allerdings durch kontrollierte Meßmethoden kalkulieren (SCHIPPER et al., 1978).

Da die meisten Ergebnisse in der Literatur auf der Zytophotometrie an isolierten Zellen basieren, läßt sich über den Kontrast (4) im Schnittpräparat mit seinem eigenfluoreszierenden Gewebehintergrund keine eindeutige Aussage machen. Für das von uns geforderte Kriterium der wiederholten Auswertung (5) erweist sich theoretisch das Ausbleichen der Fluoreszenz als Vorteil, da keine störenden Farbüberlagerungen zu er-

warten sind. Problematisch für weitere Studien ist die Tatsache, daß nach Säurehydrolyse der Schnitt stark verändert und damit die Zahl möglicher Folgereaktionen deutlich limitiert ist.

Eine zweite Gruppe von Fluoreszenzfarbstoffen, die zur Darstellung von Nukleinsäuren verwendet werden, sind die basischen Fluorochrome. BÖHM (1972) nennt drei wichtige Vertreter dieser Gruppe: 1. Ethidiumbromid, 2. Acridin-Orange und 3. verschiedene Diaminoacridine (Proflavin, Acriflavin, Acridin-Gelb).

HAAG, TSCHAHARGANE und GOERTTLER (1971) untersuchten die Spezifität von Ethidiumbromid am histologischen Schnitt der Haut und wiesen nach, daß keine spezifische Bindung an Nukleinsäuren erfolgt und damit quantitative Bestimmungen allenfalls bedingt möglich sind.

Acridin-Orange (AO) wurde von BUKATSCH und HAITINGER (1940) als Fluorochrom eingeführt. Bei EXNER (1940), einem Mitarbeiter Haitingers, findet sich ein erster Hinweis auf die AO-Färbung am Nervengewebe, bei der es zur Darstellung von Markscheiden kam. Im selben Jahr wurden die Untersuchungen STRUGGERs bekannt (siehe Zusammenfassung von 1949), der feststellte, daß nach AO-Färbung lebendes Protoplasma grün, totes dagegen rot fluoreszierte; diese Beobachtung wurde allgemein als "STRUGGER-Effekt" bekannt.

GÖSSNER (1949) untersuchte als erster systematisch die AO-Färbung an fixierten Gewebeschnitten und beschrieb rot-fluoreszierende Kerne und rot-fluoreszierendes Zytoplasma, wobei letzteres nach Ribonuklease-Behandlung nicht mehr nachweisbar war. SCHÜMMELFEDER (1950) beschrieb isolierte fixierte und unfixierte Nervenfasern des Frosches, bei denen sich mit AO das Neurokeratingerüst und die Kerne der Schwannschen Zellen rot darstellten. AO-gefärbte Nervenzellen im Schnittpräparat wurden zum ersten Mal von KRIEG (1953) beob-

achtet. Er beschrieb, daß sich Chromatinstrukturen in Kern und Nukleolus gelb färbten und daß innerhalb des grünfluoreszierenden Zytoplasmas kupferrot-fluoreszierende Nissl-Schollen zu beobachten seien. ZEIGER, HARDERS und MÜLLER (1951/52) unternahmen Vitalfluorochromierungen an peripherem Nervengewebe vom Frosch. Bei den Färbeversuchen am Paraffinschnitt von HICKS und MATTHEI (1955) ergaben sich orange gefärbte Kerne. BERTALANFFY und BICKIS (1956) unternahmen eine systematische Analyse der Farbstoffkonzentrationen, Färbezeiten und pH-Werte bei der AO-Fluorochromierung an isolierten und fixierten Leberzellen der Ratte und Maus: Kerne stellten sich grün dar, im Zytoplasma fanden sich rotfluoreszierende Granula, die nach RNase Behandlung verschwanden. Wegen der unterschiedlichen Anfärbung von Tumorzellen und normalen Zellen schlug BERTALANFFY (1962) dann vor, das AO-Fluoreszenzbild für die zytologische Tumordiagnostik einzuführen. SCHÜMMELFEDER, KROGH und EBSCHNER (1958) führten umfangreiche Färbungsanalysen mit AO an Kleinhirnschnitten der Maus durch. Dabei gaben sie für die Anfärbung der nukleinsäurehaltigen Strukturen einen optimalen pH-Bereich von 0,65 bis 1,5 an, bei dem das entstandene Fluoreszenzbild ähnlich dem der Gallocyanin-Chromalaun-Färbung war.

Nachdem eine Bindung von AO an nukleinsäurehaltige Zellstrukturen festgestellt worden war, folgten zahlreiche Untersuchungen über das Bindungsverhalten und die zugrunde liegenden chemischen Mechanismen. ZANKER (1952) wies in wässrigen AO-Lösungen eine konzentrationsabhängige Bildung von AO-Polyanionen nach. ARMSTRONG und NIVEN (1957) diskutierten einen metachromatischen Effekt bei der AO-Färbung. Auch SCHÜMMELFEDER, EBSCHNER und KROGH (1957) wiesen auf die differente Färbung von DNS-haltigem Karyoplasma und RNS-haltigem Zytoplasma hin und sahen die Ursache dafür in dem unterschiedlichen Polymerisationsgrad von DNS und RNS. STEINER und BEERS (1959) untersuchten daraufhin die Inter-

aktion von AO mit künstlichen und isolierten natürlichen Polynukleotidketten. Nach diesen Untersuchungen geht das AO-Molekül eine elektrostatische Bindung mit der Phosphatgruppe des Ribose-Moleküls in den Polynukleotidketten ein. LOESER, WEST und SCHOENBERG (1960) bestätigten diese elektrostatische Bindung von AO an die Phosphatgruppen. LERMAN (1961) gab als weiteren Bindungsmechanismus eine Interkalierung der AO-Moleküle zwischen die Basenpaare der leicht entfalteten Doppelhelix an. RIGLER (1966) wies mit mikrofluorometrischen Messungen nach, daß im Abstand von drei Basenpaaren ein AO-Molekül interkaliert wird. PRITCHARD, BLAKE und PEACOCKE (1966) geben ein sterisches Modell dieser Interkalierung an, das die heute allgemein akzeptierte Grundlage für die AO-Bindung an DNS bietet (PEARSE, 1972). Demnach beruht die Bindung von AO an DNS und RNS auf zwei histochemischen Mechanismen:

1. Elektrostatische Bindung von AO an die Phosphatgruppen der Nukleotidketten,
2. Interkalierung von AO zwischen die Basenpaare der Doppelhelix.

Diese Mechanismen bilden die Grundlage der differenten Anfärbung von isolierten Einzelzellen und Zellen im Schnittpräparat (PEARSE, 1972).

Nachdem die Bindungsmechanismen eine weitgehende Aufklärung erfahren hatten, fand AO dann eine breitere Anwendung in der Zytophotometrie an isolierten Zellen in statischen und Durchflußsystemen, bei denen der DNS- und RNS-Gehalt über die Fluoreszenzmenge quantifiziert wurde (GOLDEN und WEST, 1974; TRAGANOS, DARYZKIEWICZ, SHARPLESS und MELAMED, 1977; NICOLINI, BELMONT, PARODI, LESSIN und ABRAHAM, 1979). COWDEN und CURTIS (1976) wiesen an isolierten Zellkernen des Mäuse-ZNS einen konstanten Fluoreszenzwert für die verschiedenen Zellkerne nach und folgerten daraus, daß AO für zytophotometrische Messungen eine ausreichende Konstanz aufweist. Neben der

breiten Verwendung von AO in der Zytophotometrie finden sich neuerdings Anwendungen von AO am Schnittpräparat. So färbte DUTT (1981) Schnitte von Rattenleber nach RNS-Extraktion mit AO.

Legt man an die AO-Färbung das Kriterium der Konstanz (1) an, so ergibt sich wie bei der Feulgen-Färbung das Problem des Ausbleichens, das jedoch durch geeignete Maßnahmen im instrumentellen Aufbau zu lösen ist. Aus der weiten Anwendung für quantitative Studien in der Zytophotometrie läßt sich eine weitgehende Reproduzierbarkeit (2) ableiten. Eine Spezifität (3) von AO für die Nukleinsäuren anzunehmen, liegt nach den oben zitierten Arbeiten über das Bindungsverhalten nahe. Die differente Anfärbung von RNS- und DNS-haltigen Zellstrukturen könnte Probleme bei einer automatischen Auswertung mit sich bringen. Der Kontrast (4) im Schnittpräparat muß untersucht werden, da sich neben der Zellfluoreszenz immer eine fixierungsabhängige Eigenfluoreszenz zeigt (PEARSE, 1972; KATER und NICHOLSON, 1973). Aus dem Ausbleichen der Fluoreszenz ergibt sich wiederum ein Ansatz für eine Kombinierbarkeit (5) mit anderen Färbungen. Die Problematik einer relativ starken Zerstörung histochemischer Strukturen, wie bei der Hydrolyse der Feulgen-Methode, scheint sich bei der AO-Fluorochromierung nicht zu stellen.

Die oben angeführten Diaminoacridine bilden Farbstoffkomplexe mit Nukleinsäuren, die mit geringen Modifikationen dem Bindungsverhalten von AO entsprechen (BÖHM, 1972). Diese Farbstoffe scheinen gegenüber dem eingehend untersuchten und schon seit langem angewandten AO keine Vorteile zu bieten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Brauchbarkeit von Fluoreszenzfärbemethoden zur Darstellung der Zytoarchitektonik am Schnittpräparat mit anschließender automatischer Analyse im Vergleich zur CV-Methode untersucht werden. Dabei werden die genannten fünf Kriterien zugrunde gelegt, wobei insbesondere

auch die Kombinierbarkeit mit anderen histologischen Verfahren im Hinblick auf eine möglichst weitreichende Auswertung des Präparates von Bedeutung ist. Aus der Analyse der Zytoarchitektonik sollen dann morphometrische Befunde extrahiert und zusammen mit anderen relevanten histologischen Parametern stereologisch rekonstruiert werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Gewebepräparation

Für unsere Studie verwendeten wir Hirnschnitte von Albinoratten (HN Wistar II), die nach folgendem Verfahren angefertigt wurden: Die Tiere wurden in tiefer Äthernarkose nach der Methode von SCHULTZ und CASE (1970) zunächst mit 0,5 ml (10.000 USP-U) Natriumheparinat, dann 50 ml NaCl- bzw. Ringer-Lösung und schließlich 500 ml 4% 0,1 M phosphatgepuffertem Formaldehyd (pH 7,34,1600 mosmol) über einen Zeitraum von 30 min. bei Zimmertemperatur und einem Druck von 110 mm Hg perfundiert. Anschließend wurden die Ratten dekapitiert und die Gehirne präpariert. Die Einbettung erfolgte mit Methylbenzoat als Medium in Paraffin. Von den einzelnen Gehirnen wurden Serienschnitte mit Schnittdicken von 5 oder 20 µm in der Frontalebene angefertigt. Zusätzlich wurden 5 oder 20 µm dicke Frontalschnitte von Bouin-fixierten, Paraffin-eingebetteten und gefriergeschnittenen Gehirnen verwandt.

2. Histologische Verfahren

2.1 Acridin-Orange (AO)

Es wurde eine Charge AO der Chroma-Gesellschaft, Stuttgart, benutzt (C.I.Nr. 46.005 nach CONN, 1961; Schultz-Nr. 902, SCHULTZ, 1931). Hieraus wurde nach der Empfehlung von BERTALANFFY und BICKIS (1956) eine AO-Stammlösung mit der Verdünnung 1:1000 (1g AO auf 1 l Aqua bidest.) hergestellt. Diese so bereitete Stammlösung war in einer dunklen Glasflasche bei 4° C im Kühlschrank für mindestens einen Monat haltbar, bei längerer Lagerung wurde wiederholt Pilzwachstum beobachtet. Aus der Stammlösung wurden verschiedene Gebrauchslösungen erstellt, bei denen zur Verdünnung und Variation des pH-Wertes Aqua bidest., Ringer-Lösung und ein

Glyzin-HCl-Puffer nach Sörensen (Wissenschaftliche Tabellen, CIBA, 1977) verwendet wurden.

Um ein nach den in der Einleitung gegebenen Kriterien optimales Färbeverfahren zu entwickeln, wurden sowohl an Formalin-fixierten, entparaffinierten als auch Bouin-fixierten, gefriergeschnittenen Gehirnen die Schnittdicke, die Farbstoffkonzentration, der pH-Wert der Färbelösung und die Färbedauer variiert. Die AO-Konzentrationen schwankten zwischen $1:10^3$ und $1:5x10^6$, die pH-Werte zwischen 1,2 und 7,0 und die Zeit zwischen 1 min. und 20 h. (Tab. 1). Nach der Fluorochromierung wurden alle Schnitte für 2 x 5 min. in Aqua bidest. gespült, an der Luft getrocknet und gleich danach mit Immersionsöl bedeckt.

Nach Beurteilung des Färbeerfolges (s. Ergebnisse 1.1.1) stellte sich folgendes Verfahren als optimal heraus:

1. AO-Stammlösung 1:1000
2. Pufferlösung für pH 1,2 (Glyzin-HCl-Puffer nach Sörensen) bestehend aus
   110 ml Komponente A (0,1 M Glyzin = 7,507 g
   und 0,1 N NaCl = 5,844 g auf 1 l Aqua bidest.) und
   890 ml Komponente B (0,1 N HCl)
3. AO-Gebrauchslösung 1:50 000 aus 1 Teil AO-Stammlösung und 49 Teilen der Pufferlösung
4. AO-Färbung für 30 min.
5. Wässerung für 2 x 5 min. in Aqua bidest.

Tab. 1: Färbeversuche

A) Bouin-fixierte Gefrierschnitte:

Verdünnung der AO-Färbelösung	Verdünnungs-lösung	Puffer pH	Dauer min.	Schnitt-dicke /um
1 : 1 000	Aqua bidest.	7,0	1,3,5	5,20
1 : 5 000	Aqua bidest.	7,0	1,3,5	5,20
1 : 50 000	Glyzin-HCl	2,0	30,60	5,20
	Glyzin-HCl	1,2	30,60	5,20
1 : 500 000	Glyzin-HCl	2,0	60,300	5,20
	Glyzin-HCl	1,2	60,300	5,20

Tab. 1: Färbeversuche

B) Formaldehydfixierte Paraffin-Schnitte, entparaffiniert

Verdünnung der AO-Färbelösung	Verdünnungslösung	Puffer pH	Dauer min/h	Schnittdicke µm
1 : 1 000	Aqua bidest.	7,0	1,3,5	5,20
1 : 5 000	" "	7,0	1,3,5	5,20
1 : 10 000	" "	7,0	1,3,5, 15,30	5
	Ringer-Lsg.	5,5	15,30	5
	Glyzin-HCl	3,0	15,30	5
	"	2,0	15,30	5
	"	1,2	15,30	5
1 : 50 000	Aqua bidest.	7,0	15,30,60, 120	5
	Ringer-Lsg.	5,5	15,30,60, 120	5
	Glyzin-HCl	3,0	15,30,60, 120	5
	"	2,0	15,30,60 120	5
	"	1,2	15,30,60 120	5
1 : 100 000	"	3,0	1h,2h	5
	"	1,2	1h,2h	5
1 : 500 000	"	3,0	5h,20h	5
	"	1,2	5h,20h	5
1 : 1 000 000	"	1,2	1,3,20h	5
1 : 1 500 000	"	1,2	1,3,20h	5
1 : 3 000 000	"	1,2	1,3,20h	5
1 : 5 000 000	"	1,2	1,3,20h	5

2.2 Nuklealreaktion nach Feulgen

Die DNS-spezifische Feulgen-Reaktion beinhaltet eine Säurehydrolyse mit HCl und eine anschließende Färbereaktion mit Fluorochromen vom Schiff-Typ (BÖHM, 1972; KASTEN, 1959; ROMEIS, 1968). Wie von BAUER (1932) ermittelt wurde, ist die optimale Dauer der Hydrolyse in starkem Maße abhängig von der verwendeten Objektfixierung. Sie muß so jeweils neu ermittelt werden (GABE, 1976; ROMEIS, 1968). RUCH (1966) empfiehlt für Formalin-fixiertes Material eine optimale Hydrolysezeit von 8 min. mit 6 N HCl bei 20° C bzw. 15 min. mit 1 N HCl bei 60° C. GABE (1976) gibt für Formalin-Fixierung ein Optimum bei einer Hydrolyse von 8 min. in 1 N HCl bei 60° C an. Aufgrund der angegebenen Empfehlungen wurden entparaffinierte Schnitte (5, 20 µm) einem Hydrolyse-Prozeß in 6 N HCl bei 20° C für die Dauer von 4, 8, 10, 12, 15, 20, 30 oder 60 min. unterzogen, der durch 5 min. Spülen in Wasser abgebrochen wurde. Im zweiten Schritt wurden die hydrolysierten Schnitte entweder in eine Färbelösung des typischen Vertreters der Reagenzien vom Schiff-Typ, dem Pararosanilin, oder in eine Färbelösung von BAO (2,5-bis-4 '-amino-phenyl-(1') - 1,3,4-oxdiazole) eingestellt. BAO wird von RUCH (1966) wegen seiner hohen Stabilität unter UV-Anregung empfohlen.

Die Pararosanilin-Farblösung wurde nach BÖHM und SPRENGER (1968) nach dem Verfahren nach GRAUMANN (1953) folgenderweise hergestellt: 0,5 g des Farbstoffes wurden in 75 ml 1 N HCl bis zur Lösung aufgeschüttelt; 25 g $Na_2S_2O_5$ wurden in 425 ml Aqua dest. aufgelöst und zur Pararosanilinlösung gegeben; diese wurde im Dunkeln für 24 Stunden gelagert und danach mit 2,5 g Aktivkohle für 2 min. aufgeschüttelt und gefiltert.

Die BAO-Lösung wurde nach RUCH (1966) bereitet: 10 ml einer wässrigen 0,01%igen BAO-Lösung wurden mit 1 ml 1 N HCl und 0,5 ml 10% $NaHSO_3$-Lösung versetzt und anschließend gemischt und gefiltert.

Die Färbezeiten variierten zwischen 30 und 120 min. Abschließend wurden die Schnitte 3 mal für jeweils 2 min. in SO_2-haltiges Wasser (Sulfitwasser: 100 ml Aqua bidest., 10 ml 1 N HCl, 10 ml 10% $NaHSO_3$-Lösung) überführt und zuletzt 10 min. lang in Wasser gewaschen.

2.3 Nissl-Methode mit Cresyl-Violett (CV)

Die entparaffinierten Schnitte von 5 bzw. 20 µm wurden für 10 min. in 1% wässriger CV-Lösung im Wärmeschrank bei 40° C inkubiert, kurz in Wasser eingetaucht, in Alkohol differenziert und eingebettet.

2.4 Autoradiographie

Erwachsenen Tieren wurde 50 µCi Leuzin ins Auge injiziert, und nach einer Überlebenszeit von 8 Tagen wurden die Gehirne präpariert. Die autoradiographische Behandlung und die reflektionsphotometrische Messung der Silberkorndichten in ausgewählten Arealen erfolgte wie bei MAI (1978a) beschrieben.

2.5 Kombination der AO-Färbung am Schnittpräparat mit anderen histologischen Verfahren

2.5.1 Zusätzliche Fluoreszenzfärbung

Um an AO-gefärbten Schnitten weitere Fluoreszenztechniken ohne Überlagerungseffekte anwenden zu können, mußte vorher die AO-Fluoreszenz ausgelöscht werden. Dazu wurden AO-Schnitte zur Hälfte mit schwarzem Papier abgedeckt und über 12 Stunden der Bestrahlung einer UV-Lampe ausgesetzt. Die Schnitte wurden dann im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Danach wurden ausgebleichte Schnitte mit Pararosanilin als typischem Vertreter der Feulgen-Farbstoffe, die ein anderes Bindungsverhalten als AO aufweisen, nachgefärbt.

2.5.2 Routineverfahren

AO-Schnitte wurden in den Färbeverfahren für CV und Luxol-Fast-Blue mitgeführt. Anschließend wurden diese Schnitte auf Unterschiede im Färbemuster und hinsichtlich der Differenzierbarkeit untersucht.

2.5.3 Autoradiographie

Autoradiographische Schnitte waren mit einer Emulsion beschichtet. Es wurde geprüft, ob AO in wässriger Lösung durch die Emulsion das Gewebe färbt, und ob sich Wechselwirkungen mit der Emulsion oder den Silberkörnern ergaben.

2.5.4 Immunperoxydase-Verfahren

AO-gefärbte Schnitte wurden zusammen mit ungefärbten einem Immunperoxydase-Verfahren unterzogen. Anschließend wurde geprüft, ob die Immunperoxydase-Reaktion auch unter diesen Bedingungen ungehindert eintrat.

3. Mikroskopische Ausrüstung

3.1 Auflichtfluoreszenz-Einrichtung

Die folgende Abbildung (Abb. 1) zeigt schematisch den Strahlengang des verwendeten Auflichtfluoreszenz-Illuminators 2.1 nach Ploem von Leitz (KOCH, 1972).

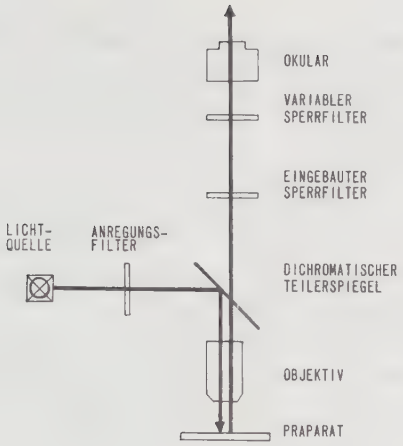


Abb. 1 Strahlengang am verwendeten Fluoreszenzmikroskop: Aus einer stromstabilisierten Quecksilberhöchstdrucklampe (100 W) gelangt das Licht über einen dichromatischen Teilerspiegel von oben durch die immersionsfähigen Objektive (Fluoreszenzobjektive 10/0.45, 100/1.25) auf das Präparat. Durch eine variable Aperturblende kann der Lichtkegel auf 80 um in der Objektebene bei einer Objektivvergrößerung von x100 begrenzt werden. Zwischen Lichtquelle und Präparat befindet sich ein Anregungsfilter. Ein eingebauter Sperrfilter ist zwischen Präparat und Auge des Beobachters bzw. Eingang des Photometers. Ein zweiter variabler Sperrfilter läßt sich über einen Sperrfilterschieber zusätzlich in den Strahlengang bringen. Die Sperrfilter sind so zu wählen, daß die Durchlässigkeit für den Bereich des von dem jeweiligen Farbstoff emittierten Lichtes möglichst hoch ist (s. Tab. 2). Die Kombination für die Anregungs- und Sperrfilter ist den Eigenschaften der verschiedenen Fluorochrome entsprechend gewählt.

Tab. 2: Tabelle der Filter

Farbstoff	Anregungsspektrum	Eingebauter Sperrfilter	Variabler Sperrfilter
AO	450 - 490 nm	515 nm	580 nm
Pararosanilin	530 - 560 nm	580 nm	ø
BAO	355 - 425 nm	460 nm	ø

3.2 Mikroskopphotometer

Für die photometrischen Messungen wurde das MPV 1 (Mikroskopphotometer mit variabler Meßblende, Leitz, Wetzlar) benutzt. Dieses Photometer wurde mit folgenden optischen Einrichtungen ausgestattet:

1. Auflichtfluoreszenz-Einrichtung zur Emissionsphotometrie an AO-, BAO- und Pararosanilin-gefärbten Schnitten,
2. Durchlichteinrichtung zur Transmissionsphotometrie an CV-gefärbten Schnitten,
3. Auflichteinrichtung zur photoelektrischen Zählung von Silberkörnern in autoradiographischen Schnitten.

Die gesamte Anordnung ist in Abb. 2 dargestellt.

Um in einem größeren Areal eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen, sollten die Einzelmeßfelder möglichst klein gewählt werden. Dafür kamen zwei Meßfeldblenden zur Anwendung, die bei Position 4 in den Strahlengang gebracht wurden. Eine runde Meßfeldblende wurde so gewählt, daß ein Durchmesser von 2,5 µm in der Objektebene resultierte. Eine quadratische Meßfeldblende wurde so eingestellt, daß sich eine Kantenlänge von 10 um in der Objektebene ergab. Die Angaben für die Objektebene beziehen sich auf eine Gesamtvergrößerung von x1000.

3.3 "Scanning"-Verfahren

Auf einem Kreuztisch wurden mit in x- und y-Richtung angebrachten Schrittmotoren Schnittareale mäanderförmig durchfahren. Dabei wurde die minimale Schrittweite von 10 µm vorgegeben, die in 0,7 sec. durchfahren wurde. Um feinere Analysen, wie ein mäanderförmiges "Scanning" durch eine Einzelzelle zu ermöglichen, mußte die Schrittweite weiter herabgesetzt werden. Dazu wurde folgende Anordnung entwickelt: ein hydraulischer Mikrovortrieb (Micro Drive, David Kopf Instr.) wurde so an die Achsen des Scanning-Tisches gekoppelt, daß beliebig kleine Schrittweiten möglich wurden.

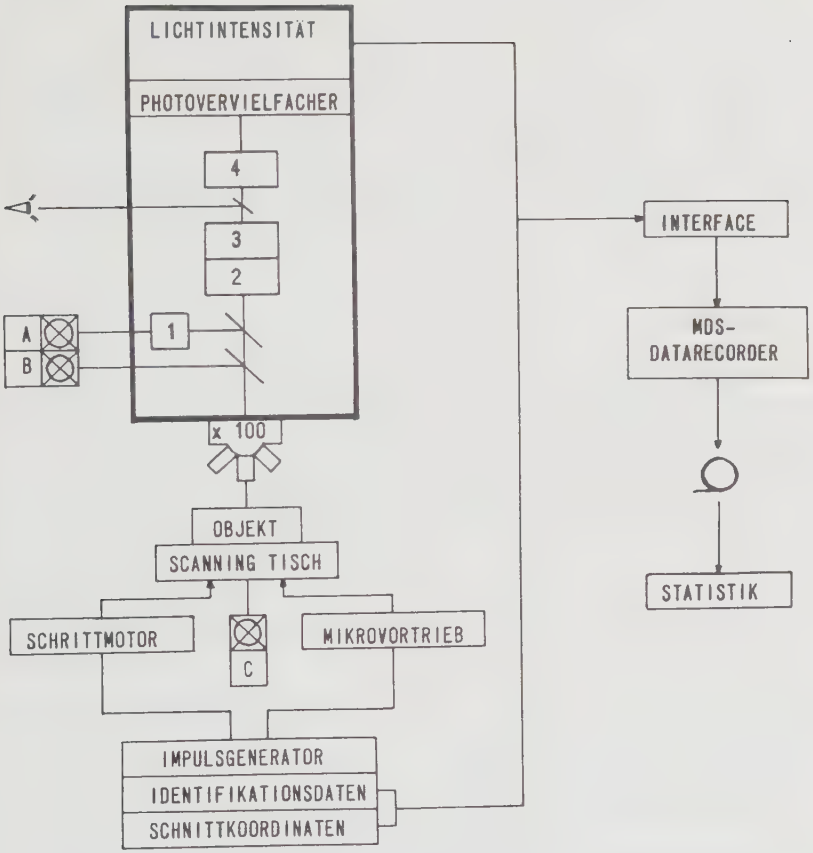


Abb. 2: Schematische Darstellung von Meßeinrichtung, mikroskopischem Aufbau und Datenverarbeitung.

A = Lichtquelle der Auflichtfluoreszenzeinrichtung,
B = Lichtquelle der Auflichteinrichtung zur photometrischen Zählung von Silberkörnern,
C = Lichtquelle der Durchlichteinrichtung,
1 = Anregungsfilter, 2 = eingebauter Sperrfilter,
3 = variabler Sperrfilter und 4 = Meßfeldblende.

3.4 Datenverarbeitung

Um jedem Photometerwert auch das ihm entsprechende Schnittareal zuordnen zu können, wurde dieser zusammen mit den (x, y)-Koordinaten erfaßt. Dazu wurden die Photometerwerte über einen Analog-Digital-Wandler in Digitalwerte überführt und zusammen mit den Meßpunktidentifikationsdaten über ein Interface in Blöcken auf Magnetband geschrieben (MDS-Datarecorder) und im Rechenzentrum der Universität Düsseldorf bearbeitet.

4. Photometrische Analyse

Die Färbecharakteristika der Fluoreszenzmethoden (AO, Pararosanilin und BAO) und der Nissl-Methode (CV) wurden verglichen. Messungen an Einzelzellen werden im folgenden ZYTOPHOTOMETRIE genannt (4.1). Ziel der Zytophotometrie war, die für eine automatische Auswertung wichtigen Kriterien Konstanz, Reproduzierbarkeit und Kontrast zu untersuchen.

Anschließend wurden Schnittareale analysiert, im folgenden HISTOPHOTOMETRIE genannt (4.2).

Photometrie von Fluoreszenzlicht wird im folgenden als Emissionsphotometrie, Photometrie an CV-Schnitten als Transmissionsphotometrie bezeichnet.

4.1 Zytophotometrie

Bei der Zytophotometrie wurde bei einer Gesamtvergrößerung von x 1000 die runde Meßfeldblende in das oben beschriebene Mikroskopphotometer eingesetzt, so daß ein wahrer Meßfelddurchmesser von 2,5 µm in der Objektebene resultierte. Große und kleine Nervenzellen sowie Gliazellen konnten mit dem hydraulischen Mikrovortrieb mäanderförmig mit einer Schrittweite von 2 µm durchfahren werden. Mit dieser Anordnung wurden sowohl emittierte Lichtmengen von AO-, Pararosanilin-

und BAO-Präparaten, als auch transmittierte Lichtmengen von CV-Schnitten photometrisch bestimmt.

Will man anhand der gemessenen Lichtmengen Aussagen über die vorliegenden Substanzmengen machen, so muß man nach RUCH und BOSSHARDT (1963) berücksichtigen, daß nur unter der Bedingung einer Proportionalität zwischen Fluorochrom (hier AO, BAO, Pararosanilin) und Substanzmenge (Nukleinsäuren) auch eine Proportionalität zwischen Substanzmenge und Lichtmenge besteht. Die Emissionsphotometrie liefert dann relative Werte der Substanzmengen und macht damit den hier beabsichtigten Vergleich solcher Substanzmengen verschiedener Strukturen möglich. Nur wenn absolute Werte verlangt werden, ist zusätzlich der Vergleich mit einem Standardpräparat nötig (RUCH und BOSSHARDT, 1963). Bei der Transmissionsphotometrie von Nissl-Farbstoffen besteht diese Proportionalität zwischen Substanzmenge (Nukleinsäuren) und Farbstoffmenge nicht. Auch zwischen Farbstoffmenge und transmittierter Lichtmenge besteht keine streng proportionale Beziehung, so daß Differenzen von Photometerwerten nur als größere oder kleinere Farbstoffmengen interpretiert werden dürfen, wobei exakte Relationen nicht angegeben werden können.

4.1.1 Kontrast-Definition

Nach FRANKE (1969) ist Kontrast (K) definiert als Leuchtdichteunterschied zweier Felder ($B_1 - B_2$) bezogen auf die Leuchtdichte eines der beiden Felder (B_1 oder B_2), also:

$$K = \frac{B_1 - B_2}{B_1}$$, für K zwischen 0 und 1 und B_1 größer B_2 bzw.

$$K = \frac{B_1 - B_2}{B_2}$$, für K zwischen 0 und Unendlich und B_1 größer B_2.

Wenn es gilt, gefärbte Zellen von der Umgebung (in diesem Fall Neuropil) zu unterscheiden, so ist nach FISCHMEISTER (1967) der Kontrast (K) definiert als relativer Helligkeits-

unterschied ($h - h_o$) des Objekts (h) von seiner Umgebung (h_o), also:

$$K = \frac{h - h_o}{h_o} .$$

Da die hier gemessenen Kontraste fast ausschließlich größer als 1 waren, wurde in dieser Arbeit die Definition von FISCHMEISTER benutzt, die der Definition von FRANKE für Kontraste zwischen 1 und Unendlich entspricht.

Bei der Definition des Kontrastes muß deshalb sowohl bei der Emissions- als auch der Transmissionsphotometrie ein Meßparameter für die Zelle (Objekt) und ein entsprechender für das Neuropil (Umgebung, Hintergrund) berücksichtigt werden. Damit ergeben sich, wie in der Graphik (Abb. 3) gezeigt, folgende analoge Verhältnisse.

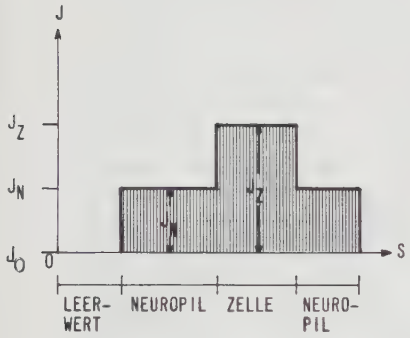
Damit sind bei dieser Kontrastdefinition alle Kontrastwerte auf den jeweiligen Hintergrund normiert. Die bei den verschiedenen Meßverfahren (Emissions- bzw. Transmissionsphotometrie) erhaltenen Kontraste (zwischen 0 und Unendlich) sind also voll vergleichbar; im Hintergrund beträgt der Kontrast definitionsgemäß K = 0.

Die Meßwerte werden dabei für Transmissionsmessungen in Relation zum Leerwert (präparatfreier Objektträger) angegeben. Sie sind damit unabhängig von der jeweiligen Beleuchtungsstärke und Photometer-Verstärkung. Wichtig ist, daß die Bedingungen während der Messung konstant gehalten werden. Hier wurde bei gleichbleibenden instrumentellen Bedingungen die Lichtintensität des Leerwertes immer auf einen konstanten Wert (2000) eingestellt.

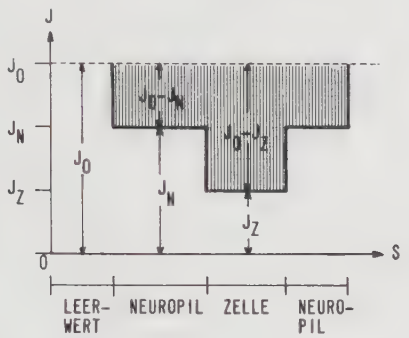
Bei den Emissionsmessungen zeigte die Färbung unter gleichbleibenden instrumentellen und optischen Bedingungen eine hohe Konstanz. So konnte als Referenzwert der Photometerwert im Neuropil (5 $\pm$ 2%) eingesetzt werden.

Abb. 3: Kontrast-Definitionen bei der Zytophotometrie

EMISSIONSPHOTOMETRIE



TRANSMISSIONSPHOTOMETRIE



J = Lichtmenge im Photometer

s = durchfahrene Wegstrecke

Meßparameter für den Leerwert (Objektträger)	$J_o = 0$	J_o = 100% Transmission
Meßparameter für den Hintergrund (Neuropil)	J_N	$J_o - J_z$
Meßparameter für das Objekt (Zelle)	J_Z	$J_o - J_N$

Setzt man in die Formel $K = \frac{h-h_o}{h_o}$ ein, so ergibt sich:

$$K = \frac{J_Z - J_N}{J_N}$$

$$K = \frac{(J_o-J_Z) - (J_o-J_N)}{J_o - J_N}$$

4.1.2 Spezielle Fluoreszenzanalyse

Im AO-gefärbten Schnitt zeigten, wie auch nach den Beschreibungen von SCHÜMMELFEDER et al. (1958) zu erwarten, verschiedene Zellklassen unterschiedliche Farbwerte. Um der Frage nachzugehen, ob die unterschiedlichen Emissionscharakteristika der verschiedenen Zellklassen die Grundlage für eine weitere Differenzierung bilden konnten, wurde der Einfluß verschiedener Sperrfilter auf die Fluoreszenzintensitäten unter Variation von Wellenlängen (495, 515, 580, 610 nm) und Dicke (1, 2, 4 mm) untersucht. Dazu wurde am MPV 1 der feste Sperrfilter ausgebaut und durch die angegebenen Sperrfilter ersetzt. An Stelle des Photometers wurde der Detektor des O.M.A. 2 (Optical Multichannel Analysis, EG & G) angekoppelt und mit dem Analysator verbunden. Dieses System analysierte die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, die direkt ausgedruckt werden konnten. Da jeweils nur eine kurzzeitige Beleuchtung des Präparates von weniger als 1 sec. nötig war, erlaubte diese Anordnung, den Einfluß sämtlicher oben angegebener Sperrfilter an derselben Präparatstelle zu untersuchen. Die Reihenfolge der Filter wurde variiert, um einen systematischen Fehler durch Ausbleichung völlig zu vermeiden.

4.2 Histophotometrie

Für die histophotometrischen Analysen wurden Schnitte durch die Area suprachiasmatica (ASC) normaler und enukleierter Tiere gewählt. Dieses Gebiet bot sich für eine automatische Auswertung an, weil sich hier auf engem Raum verschiedene histologische Strukturen finden: Ventrikel, hoch und niedrig kondensierte Zellbereiche und Fasergebiete. Zudem wurden die durch die Enukleation ausgelösten Degenerationsvorgänge untersucht. Es wurden sowohl AO- als auch CV-gefärbte Schnitte untersucht. Bei einer Gesamtvergrößerung von x 1000 wurde die quadratische Meßfeldblende eingesetzt, so daß ein wahres

Meßfeld von 10 x 10 µm resultierte. Die Frontalschnitte wurden auf dem Kreuztisch orthogonal-planar orientiert, um eine von Serie zu Serie deckungsgleiche Ausrichtung relevanter Schnittparameter (Interhemisphärenspalt und III. Ventrikel) zu erreichen. Bei den Fluoreszenzschnitten (AO) wurde diese Einstellung zur Vermeidung von Ausbleichen im schwachen Durchlicht vorgenommen. Dann wurde ein jeweils 1000 x 1000 µm großes Areal der ASC mit einer Schrittweite von 10 x 10 µm mäanderförmig durchfahren.

Bei den Fluoreszenzpräparaten mußte die Vorbeleuchtungszeit für jeden Punkt des Schnittareals berücksichtigt werden. Bei einem Lichtkegel von 80 µm und einer Schrittgeschwindigkeit von 10 µm in 0,7 sec. errechnete sich für jeden Punkt eine Vorbeleuchtungszeit von 12 sec., ausgenommen ein 40 µm schmaler Streifen, entsprechend dem halben Durchmesser des Beleuchtungskegels, am unteren, rechten und linken Rand des Meßareals. Die auf Band gespeicherten Photometerwerte wurden zusammen mit den Ortskoordinaten im Rechenzentrum der Universität Düsseldorf (TR 445) bearbeitet. Zum einen wurde die statistische Verteilung der Rohdaten einzelner histologischer Areale (Ventrikel, Chiasma opticum, SCN) analysiert und entsprechende Histogramme erstellt (vergleiche Abb. 10). Zum anderen wurden die Daten durch gleitende Mittelwertbildung von 2x2 und 5x5 Werten geglättet und die Felder ausgewählter Meßwertbereiche ausgeplottet.

4.3 Morphometrie

Die auf diesen Plots erscheinenden Trenn- oder Isokonturlinien, im folgenden "Isolinien" genannt, umschließen Punkte gleichen oder höheren Photometerwertes. Die Wahl der Schwellenwerte zur Trennung verschiedener Bereiche (hier Ventrikel und Nucleus suprachiasmaticus (SCN)) erfolgte nicht zufällig, sondern wurde aus den Histogrammen der Photometerwertverteilungen abgeleitet.

Durch Planimetrieren wurde der Flächeninhalt der so abgegrenzten Strukturen bestimmt. Aus dem Flächeninhalt und den Schnittabständen konnten dann die Volumina der Strukturen ermittelt werden.

4.4 Stereologische Darstellung

Die Abgrenzungslinien wurden mit anderen Parametern zusammen auf Folien übertragen. Andere Parameter waren die ebenfalls automatisch ermittelten Abgrenzungslinien autoradiographischer Markierungsfelder sowie manuell mit dem Projektionsmikroskop (Leitz) oder auf Photographien charakterisierte und identifizierte Einzelzellen.

Die Koordinaten aller Abgrenzungslinien wurden mit einem magneto-restriktiven Tablett (ID Data Tablet Digitizer, Summagraphics Corp.) auf Magnetband übertragen. Dieses Band wurde an das Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund, gesandt. Nach dem Programm von TECKHAUS et al. (1979) wurde die Area suprachiasmatica unter Berücksichtigung der Schnittabstände in einer dreidimensionalen Darstellung rekonstruiert.

4.5 Autoradiographie

Die Silberkornverteilung innerhalb der Area suprachiasmatica wurde nach dem von MAI (1978 a) beschriebenen Verfahren reflektionsphotometrisch ausgewertet. Die gewonnenen Rohdaten wurden nach dem in 'Histophotometrie' (4.2) beschriebenen Verfahren geglättet, als Isolinien ausgedruckt, auf Folie übertragen und schließlich, wie im letzten Abschnitt (4.4) erläutert, rekonstruiert.

5. Grauwertmessung

Die Grauwertanalyse von AO- und CV-Schnitten wurde mit dem I.B.A.S. (Interaktives Bild-Analyse-System, Kontron, München) durchgeführt. Hierbei wurde das mikroskopische Bild (bei einer

Vergrößerung von x 400) von einer Kamera aufgenommen, auf einen elektronischen Datenspeicher übertragen und auf einem Bildschirm mit 512 x 512 Bildpunkten dargestellt. Dieses Bildschirm-Bild konnte nun weiterbearbeitet werden. Es wurden verschiedene einzelne histologische Objekte (Blutgefäße, Chiasma opticum, Neuropil, Zellen) mit einem rechteckigen Fenster möglichst exakt umgrenzt. Mit dem gesamten Meßfeld wurden verschiedene Gebiete der Area suprachiasmatica (III. Ventrikel, Chiasma opticum, Gebiete des SCN zentral und peripher) erfaßt (Abb. 4). Innerhalb der Meßfelder wurden die 256 Graustufen entsprechend der internen Norm des Gerätes gemessen und nach ihrer absoluten und relativen Häufigkeit direkt als Histogramme ausgedruckt.

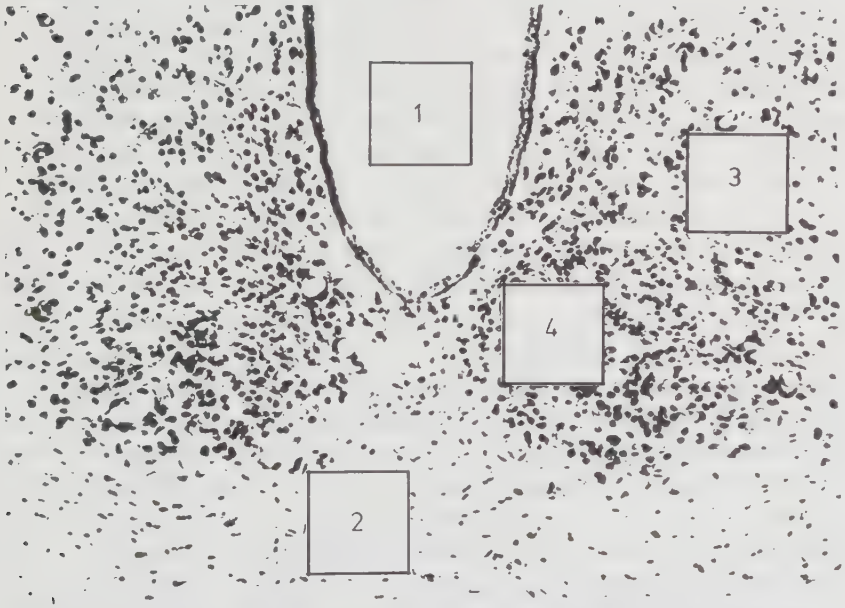


Abb. 4: Darstellung der Area suprachiasmatica. Die Kästchen (1-4) kennzeichnen die verschiedenen Gebiete, die mittels Grauwertanalyse untersucht wurden.
1. Ventrikel 2. Chiasma opticum 3. Area lateral des SCN 4. SCN

ERGEBNISSE

1. Färbeergebnisse

1.1 AO

1.1.1 Histologisches Bild

Im Fluoreszenzmikroskop wurden die fluorochromierten Schnitte, bei denen Schnittdicke, pH und Verdünnung der Färbelösung sowie Färbedauer variiert worden waren, in Hinblick auf Konstanz, Reproduzierbarkeit, Kontrast und Farbwert beurteilt. Bei 20 µm dicken Schnitten zeigte sich unabhängig von der Fixierung ein unscharfes und wenig kontrastreiches Bild, da der Hintergrund, das Neuropil, stark fluoreszierte und Zellen in der Tiefe des Schnittes sich nur undeutlich darstellten. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei gleich gefärbten 5 µm dicken Schnitten eine deutlich geringere Fluoreszenz des Neuropils und schärfer abgegrenzte Zellen. Bouin-fixierte Gefrierschnitte zeigten nach AO-Färbung gelbliche Zellen vor stark gelb-orange fluoreszierendem Neuropil. Bei Betrachtung der ungefärbten Bouin-fixierten Schnitte sah man eine von der AO-Färbung unabhängige gelbliche Grundfarbe. Alle weiteren Untersuchungen wurden daher an 5 µm dicken Schnitten durchgeführt.

Mit sinkendem pH-Wert (von pH 7,0 bis 1,2) nahm die Färbung des Neuropils erheblich ab; gleichzeitig wurden die einzelnen Zellkompartimente wie Nukleolus, Zellkern und Zytoplasma zunehmend schärfer abgrenzbar. Bei Konzentrationen von über 1:10 000 zeigten die Präparate eine sehr hohe Neuropil-Fluoreszenz. Bei Verdünnungen zwischen 1:10 000 und 1:100 000 (jeweils bei pH 1,2) stellten sich die Zellen in mit der Verdünnung abnehmender Intensität gelb-grün dar. Dabei war eine Färbedauer von 30 min. optimal; bei 15 min. resultierte eine nicht völlig gleichmäßige Färbung, bei Färbedauern von mehr als 60 min. waren die Präparate hauptsächlich im Bereich

des Neuropils überfärbt. Verdünnungen von 1:500 000 und höher ergaben hellgrüne Zellen vor dunkelgrünem Hintergrund. Färbezeiten von 1 bis zu 20 Stunden erbrachten bei diesen hohen Verdünnungen keine deutlichen Unterschiede.

Als optimales Verfahren für Formalin-fixierte Schnitte erwies sich eine Färbung bei pH 1,2 in 1:50 000 verdünnter AO-Lösung für 30 min.. Daher kam dieses Färbeverfahren bei allen zyto- und histophotometrisch ausgewerteten AO-Schnitten zur Anwendung. Diese Schnitte zeigten im Durchlicht das Bild von Nativpräparaten. Im Fluoreszenzmikroskop (Anregungsfilter 490 nm, Sperrfilter 515 nm) bot sich folgendes Bild:

- Neurone stellten sich mit einem orangen Zytoplasma, einem grün-gelben Zellkernrand und einem gelb-grünen Nukleolus dar.
- Gliazellen erschienen als homogene gelbe Scheiben.
- Ependymzellen fluoreszierten in deutlichem Gelb.
- Endothelzellen erschienen ebenfalls in Gelb.
- Neuropil fluoreszierte schwach dunkelgrün.
- Ventrikel und Gefäße erschienen als schwarze, nicht fluoreszierende Flächen.

Dieses AO-Bild mit den stark fluoreszierenden Zellen vor dunklem Hintergrund bot dem Beobachter ausgezeichnete Kontraste. Besonders deutlich wurde dies im Bereich der Ependymzellen des III. Ventrikels. Hier waren im Fluoreszenzbild sogar die Mikrovilli zu erkennen. Im CV-Bild waren solche Differenzierungen nicht möglich. Bei der dort umgekehrten Konstellation von dunklen Zellen vor hellem Hintergrund ergaben sich diese guten Kontrastbedingungen nicht.

1.1.2 Spezielle Fluoreszenzanalyse

Dieses beschriebene Zellbild bot mit seinen verschiedenen Farbwerten eine gute subjektive Unterscheidbarkeit der gefärbten Zellelemente, also gute qualitative Kontraste. Mit

dem O.M.A. wurde der Einfluß verschiedener Sperrfilter auf die Fluoreszenzintensität und die Farbwerte des AO-Präparates untersucht.

Durch Sperrfilter von 495 bis 610 nm wurde die Neuropil-Fluoreszenz stärker unterdrückt als die Zellfluoreszenz, die immer noch hohe Werte zeigte. Ein optimales Verhältnis ergab sich bei einem Sperrfilter von 580 nm (Abb. 5a). Ein Anstieg der Filterdicke von 1 auf 4 mm bewirkte eine deutlich stärkere Unterdrückung der Gliazell-Fluoreszenz verglichen mit der einer Nervenzelle (Abb. 5b). Aufgrund dieser Messungen wurde der Filter von 580 nm, bei dem sich das beste Kontrastverhältnis zeigte, als zusätzlicher Sperrfilter in den Strahlengang eingebracht. Diese Anordnung wurde dann in allen zyto- und histophotometrischen Auswertungen verwendet.

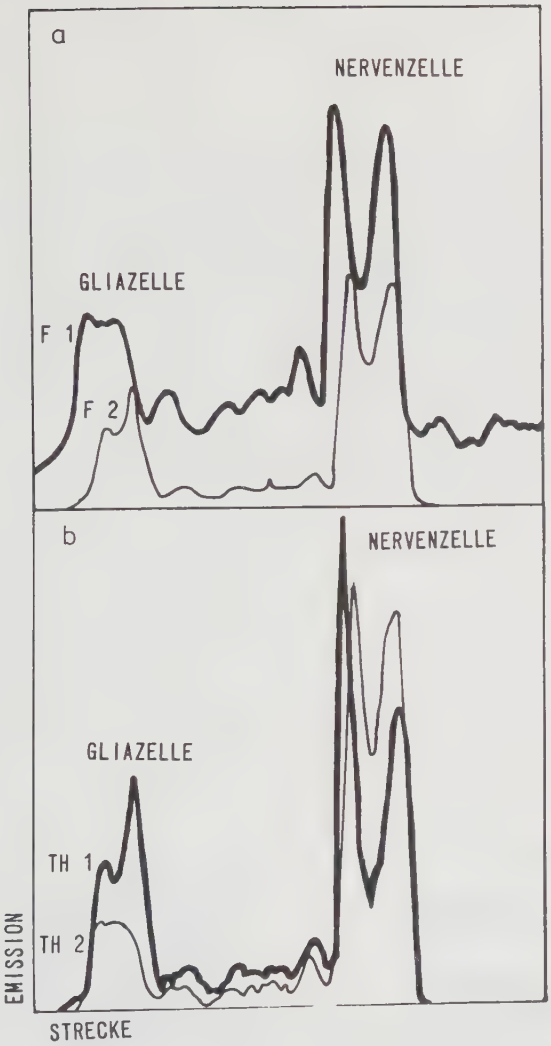


Abb. 5: Spezielle Fluoreszenzanalyse mit dem O.M.A.

Die Meßkurven zeigen den Einfluß von Sperrfiltern verschiedener Wellenlänge und Dicke auf die Emissionscharakteristika einer AO-fluorochromierten Gliazelle neben einer Nervenzelle.

a) Filter verschiedener Wellenlänge mit F1 = 495 nm und F2 = 580 nm (bei 1 mm Dicke),
b) Filter verschiedener Dicke mit Th1 = 1 mm und Th2 = 4 mm (bei 580 nm).

1.1.3 Ausbleichverhalten

Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zeigen in unterschiedlichen Geweben bedingt durch die substanzeigene Photodekomposition jeweils ein anderes Ausbleichverhalten (RUCH, 1966). Für jeden Farbstoff und für jedes verwendete Material muß daher für die photometrischen Messungen das entsprechende Ausbleichverhalten quantifiziert werden. Dazu wurde in einem 2,5 um großen Ausschnitt aus einer intensiv fluoreszierenden Zelle bei einer 1000fachen Vergrößerung der Ablauf des Ausbleichens kontinuierlich gemessen.

Die Abb. 6 zeigt die entsprechende Ausbleichkurve.

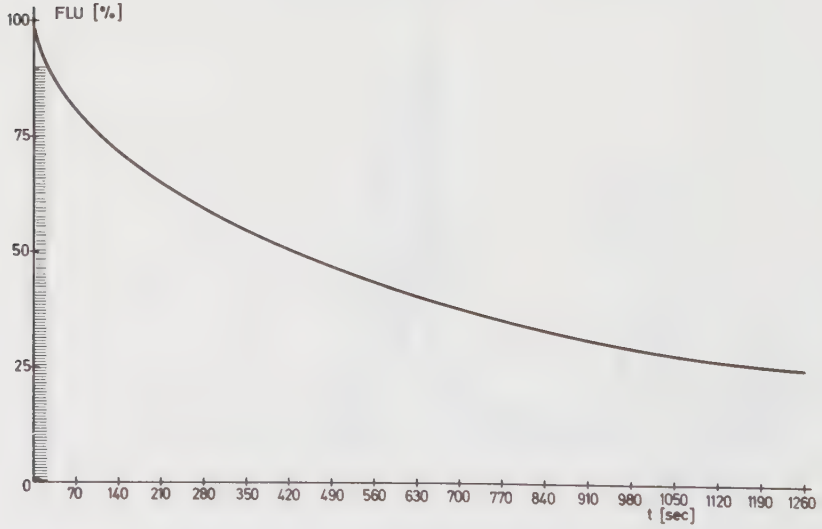


Abb. 6 Ausbleichkurve:

Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Abfall auf 90%.
Es ergaben sich folgende Werte:

95%	der	Anfangsfluoreszenz	nach	10 sec.
90%	"	"	"	22 sec.
75%	"	"	"	115 sec.
50%	"	"	"	7 min.
25%	"	"	"	21 min.
10%	"	"	"	35 min.

1.2 Nuklealreaktion nach Feulgen

Die besten Bilder für die Feulgen-Färbung ergaben sich nach einer Hydrolyse von 8 min. und einer Färbedauer von 60 min.. Mit Pararosanilin stellten sich die Nervenzellen als zarte rote Ringe mit einer feinen Körnelung und einer zentralen Aussparung an der Stelle des Nukleolus, Gliazellen hingegen als kleine homogene rote Scheiben dar. Der Hintergrund war dunkelrot und entsprach dem Fluoreszenzbild des ungefärbten Präparates.

Die BAO-Färbung brachte eine Anfärbung der gleichen Zellstrukturen wie im Pararosanilin-reagierten Schnitt. Hier war eine hellweiße Chromatinfluoreszenz vor einem grünlichweißen Hintergrund zu sehen.

2. Zytophotometrie

2.1 AO

In Cortex, Kleinhirn und Hypothalamus wurden verschiedene Zelltypen analog dem unten stehenden Schema mit der "Scanning"-Einrichtung durchfahren und die zugehörigen Zellprofile erstellt (Abb. 7).

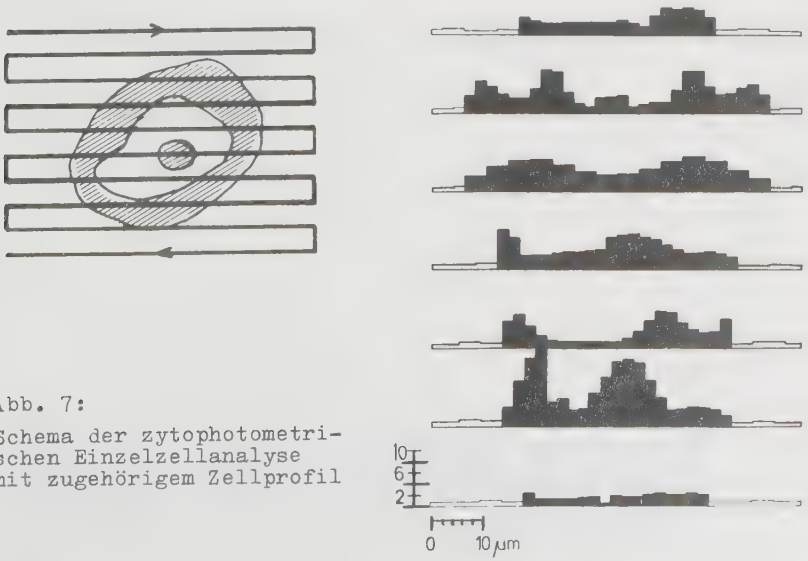
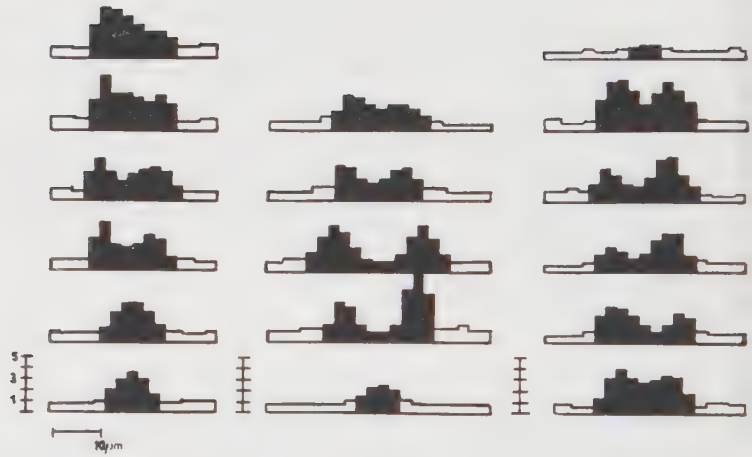
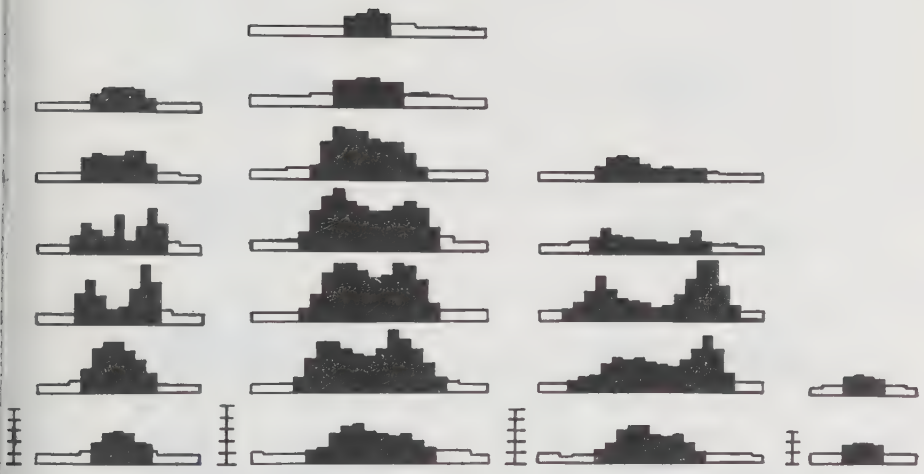


Abb. 7:
Schema der zytophotometrischen Einzelzellanalyse mit zugehörigem Zellprofil



Zelltyp	Cortexzelle	Cortexzelle	Cortexzelle
Photometer-wert	12 - 25	8 - 31	10 - 23
Kontrast	1,4 - 4,0	0,6 - 5,2	1,0 - 3,6

Abb. 8: Zellprofile der Zytophotometrie verschiedener Zelltypen. Die Darstellung ist normiert auf einen Hintergrundwert (Neuropil) von 1. Die Photometerwerte im Zellbereich sind als Vielfaches dieses Hintergrundwertes ausgedrückt.



Cortexzelle	Cortexzelle	Pyramidenzelle	Gliazelle
9 - 23	10 - 29	10 - 25	8 - 12
0,8 - 3,6	1,0 - 4,8	1,0 - 4,0	0,6 - 1,4

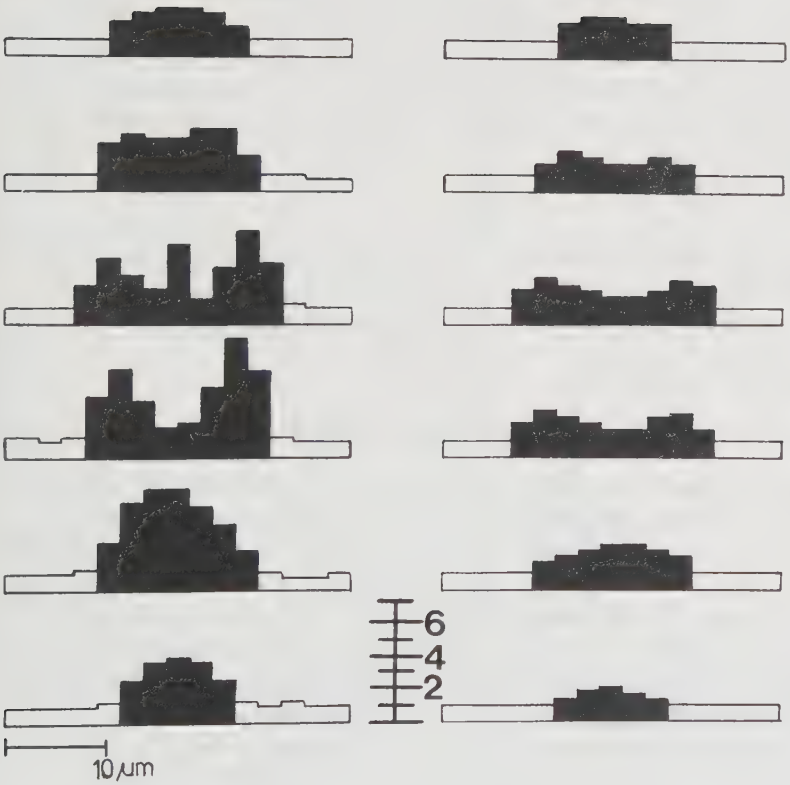
Die subjektiv beobachtete Konstanz und Reproduzierbarkeit ließ sich zytophotometrisch bestätigen. Im untersuchten Schnittmaterial schwankte der im Neuropil gemessene Wert um ± 2% um einen Photometerwert von 5. Die Kontraste ließen sich durch das Einfügen eines variablen Sperrfilters von 580 nm um 120% gegenüber den Messungen mit einem Sperrfilter bei 515 nm steigern. Unter diesen Bedingungen betrugen die Kontraste im AO-fluorochromierten Schnitt bei 200 gemessenen Zellen K = 0,6 - 14,0.

In Abb. 8 werden Zellprofile und Kontraste von 7 repräsentativen Zellen gezeigt.

2.2 Vergleich von Kontrasten nach unterschiedlichen Färbungen

Die Kontraste der Feulgen-Präparate, die mit Pararosanilin oder BAO gefärbt waren, betrugen maximal K = 2. Vergleicht man diese Kontraste mit den bei der AO-Färbung erreichten (K = 0,6 - 14,0), so ergibt sich eine eindeutige Überlegenheit der AO-Methode. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die AO-Färbung als Fluoreszenzverfahren für die weiteren Analysen ausgewählt.

Im CV-Präparat ergaben sich Kontraste zwischen K = 0,5 und 2,3. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 9) zeigt einen Kontrastvergleich zwischen einer typischen AO-gefärbten Cortexzelle und einer entsprechenden im CV-Präparat. Bei der Darstellung wurde die in 'Material und Methode' unter 4.1.1 gegebene Kontrastdefinition zugrunde gelegt. Es wird deutlich, daß die AO-Färbung eine differenziertere und authentischere Darstellung des Zellprofils erlaubte.



AO-Zelle CV-Zelle

Abb. 9: Kontrastvergleich zwischen einer AO-gefärbten Cortexzelle (K = 2,0-6,0) und einer CV-Zelle (K = 1,0-2,25)

3. Histophotometrie

Ziel der Auswertung der am AO- und Nissl-Präparat histophotometrisch gewonnenen Daten war eine reproduzierbare und objektivierbare Abgrenzung der Zytoarchitektonik. Diese sollte am Beispiel der Area suprachiasmatica (ASC) normaler und einseitig enukleierter Ratten durchgeführt werden. Dabei sollten die Nuclei suprachiasmatici, die piale Oberfläche und der III. Ventrikel sowie weitere histologische Parameter (Faserverteilung, Gefäße, Einzelzellen) dargestellt werden.

3.1 AO

Es wurden 5 µm dicke Frontalschnitte gefertigt. Jeder 10. Schnitt durch die ASC wurde nach dem angegebenen AO-Verfahren gefärbt und dann histophotometrisch analysiert.

3.1.1 Morphometrie

3.1.1.1 Meßwertverteilungen und Auswahl der Isolinien

Abgrenzungen innerhalb dieser Schnitte erfolgten mit Hilfe von Isolinien. Die Wahl dieser Linien orientierte sich an der Verteilung der Meßwerte. Dazu wurden Histogramme sowohl von der Verteilung über der gesamten ASC, als auch von der Verteilung in bestimmten Arealen wie Ventrikel, Chiasma opticum und SCN erstellt. Die in Klassen aufgeteilten aktuellen Meßwerte wurden in ihrer Häufigkeit ausgedruckt. In der Gesamtverteilung (Abb. 10a) erschienen zwei Häufigkeitsgipfel: der erste lag bei 6, der zweite bei 20, ein Minimum lag bei 7. Der Ventrikel (Abb. 10b) hatte einen Häufigkeitsgipfel bei 6, der sich in der Gesamtverteilung wiederfinden ließ. Im Chiasma opticum (Abb. 10c) lag ein Gipfel bei 18. Der SCN mit seiner unmittelbaren Umgebung (Abb. 10d) zeigte Häufigkeitsgipfel bei 26 und 35, mit einem Tal bei 32.

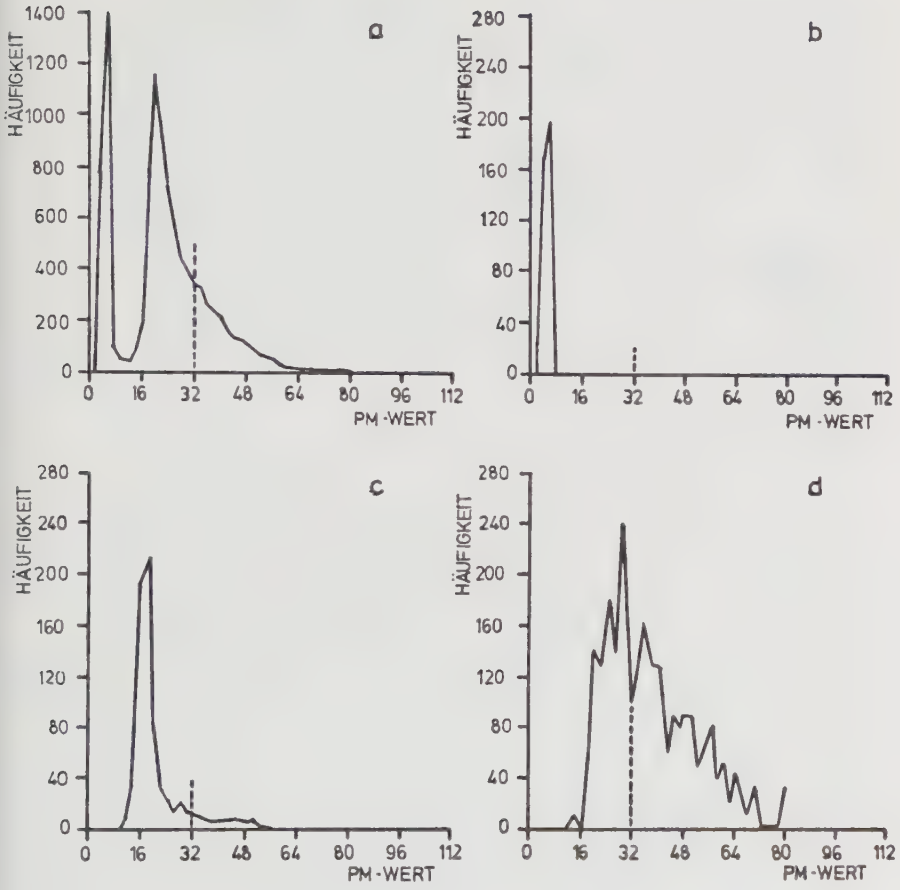


Abb. 10 Meßwertverteilungen:

Gezeigt werden Histogramme der Häufigkeitsverteilung der Photometerwerte verschiedener Areale.
a) Gesamtverteilung in der ASC, b) Verteilung im Ventrikel, c) Verteilung im Chiasma opticum, d) Verteilung im SCN und seiner unmittelbaren Umgebung.

Die Festlegung der Schwellenwerte für die Isolinien erfolgte in Anlehnung an das bei MENDELSOHN, KOLMAN und BOSTROM (1964) beschriebene Verfahren. Für Ventrikel und piale Oberfläche ergab sich als Schwelle der Wert 7. Als äußere Begrenzung des SCN wurde das Minimum bei 32 gewählt. Dieses lag zwischen den beiden Gipfeln, die einmal zellarme, weniger kondensierte Bereiche (16-32) und zum anderen zellreiche, höher kondensierte Areale (32-80) darstellten. Durch eine weitere Isolinie, die die Werteklasse zwischen dem zweiten Gipfel bei 35 und dem Wert 80 umfaßte, ließ sich innerhalb des SCN eine weitere Kondensation finden. Die durch die äußere Umgrenzungslinie definierte Struktur des SCN wird im folgenden als SCN_{ext}, die innere Kondensation als SCN_{int} bezeichnet.

Die gefundenen Schwellenwerte konnten für die gesamte Serie beibehalten werden, da die ermittelten Schwankungen der Verteilung von Schnitt zu Schnitt gering variierten. Am Beispiel des Schnittes "50" wird gezeigt (Abb. 11) wie beim Übergang von einem willkürlichen Schwellenwert 25 zum ermittelten Wert 32 die äußere Abgrenzung des SCN deutlich wird. In Abb. 11b erkennt man, daß innerhalb des durch die 32-Isolinie begrenzten SCN_{ext} eine weitere Kondensation als SCN_{int} definiert gibt.

Abb. 11 Wahl der Isolinien:
Die Schraffur kennzeichnet den SCN_{int}. Die ausgeplotteten Zahlen entsprechen der programminternen Kodierung. Weitere Erläuterungen s. Text.

3.1.1.2 Darstellung der ASC mit Isolinien

Nach Bearbeitung der Rohwerte mit einer Glättungsmatrix von 5x5 wurden die Isolinien 7, 32 und 35 ausgedruckt und gezeichnet. Dadurch konnten auf jedem Ausdruck die Abgrenzungslinien für den III. Ventrikel, die piale Oberfläche und den SCN dargestellt werden. Nachfolgend sind vier Schnitte durch den SCN zu sehen (Abb. 12). Dabei liegt der linke SCN contralateral zur Enukleation. Im Rahmen der durch die Enukleation ausgelösten Umbauvorgänge ist die Lage der SCN zueinander und zur pialen Oberfläche, wie auf den Bildern deutlich wird, verändert.

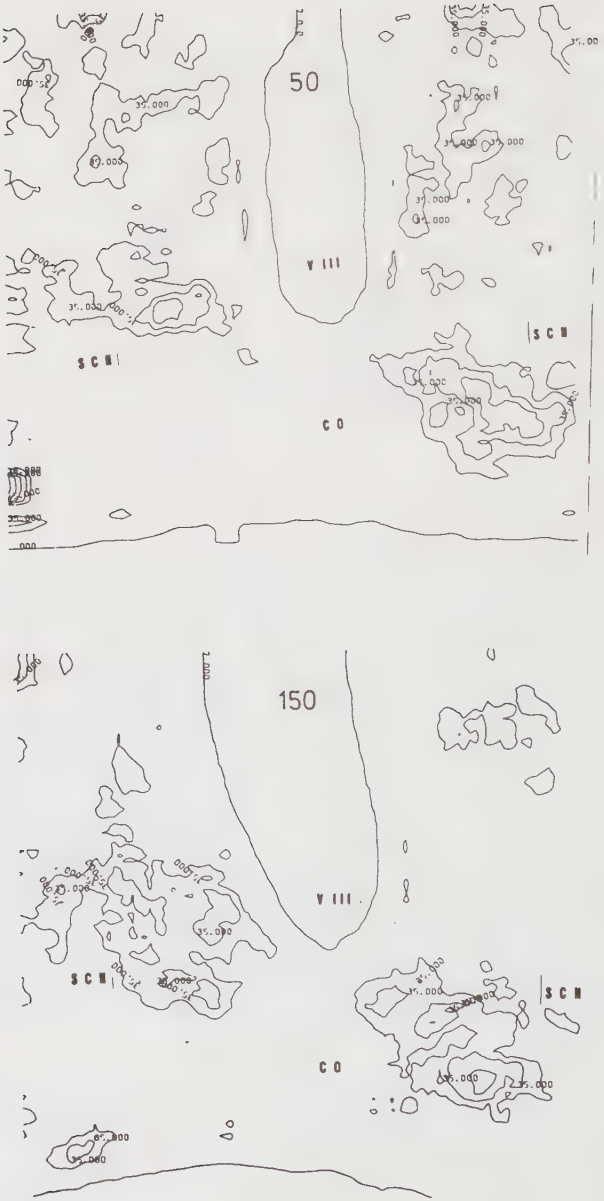


Abb. 12 Darstellung der ASC mit Isolinien:

Die Schnitte sind durch Zahlen gekennzeichnet, die dem Abstand vom anterioren Pol des SCN in um entsprechen. CO = Chiasma opticum, SCN = Nucleus suprachiasmaticus, V III = III. Ventrikel.

200
V III
SCH
SCH
CO
35.000
35.000
35.000

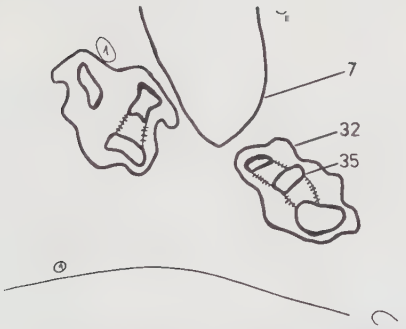
Für die weitere Bearbeitung, insbesondere auch im Hinblick auf die später durchzuführende Rekonstruktion, mußten die Begrenzungslinien in mehreren Arbeitsgängen geglättet werden. Die jeweils auftretenden Flächendifferenzen wurden planimetrisch kontrolliert und entsprechend korrigiert. Innerhalb des SCN_{ext} wurde eine weitere Kondensation unter Verwendung von 2x2 geglätteten Isolinien zu einer zusammenhängenden Struktur, dem SCN_{int}, zusammengefaßt. Dieser Arbeitsvorgang ist in Abb. 13 dargestellt.

In Abb. 14 sind die geglätteten Computerausdrucke der ASC einer AO-gefärbten Schnittserie zusammen mit den planimetrisch bestimmten Flächenwerten für den SCN_{ext} und SCN_{int} dargestellt. Dabei gibt die Schnittnummer den Abstand des betreffenden Schnittes vom anterioren Pol des SCN an.

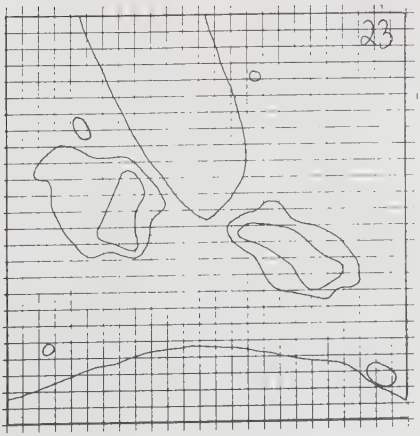
Abb. 13 Glättung der Isolinien:
a) Originalausdruck, b) erster Glättungsschritt,
c) endgültige Version im Kontrollausdruck

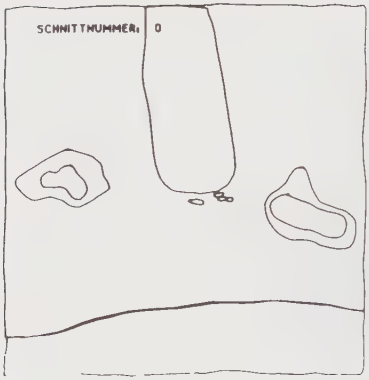
a

b



c



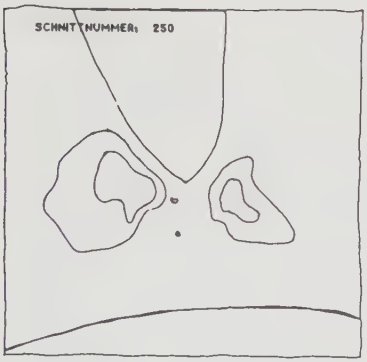


SCN_{ext}	24	31
SCN_{int}	6	13

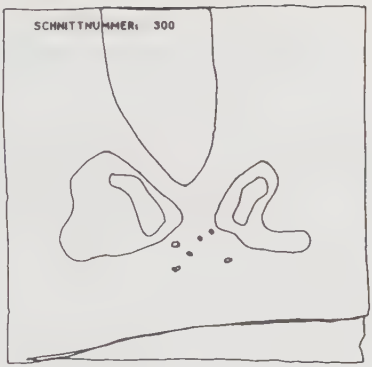
SCN_{ext}	24	49
SCN_{int}	7	20

SCN_{ext}	59	45
SCN_{int}	12	19

SCN_{ext}	69	42
SCN_{int}	19	10



SCN_{ext}	76	35
SCN_{int}	20	6



SCN_{ext}	64	32
SCN_{int}	11	6

SCN_{ext}	55	23
SCN_{int}	4	3

Abb.14 Geglättete Computerausdrucke der ASC zusammen mit den planimetrisch bestimmten Flächenmaßen (Werte in $mm^2 \times 10^{-2}$) für den SCN_{ext} und SCN_{int}. Die Maßzahl des SCN_{ext} entspricht der gesamten Fläche, die durch die äußere Begrenzungslinie umschlossen wird.

3.1.1.3 Morphometrische Befunde des SCN

Aus den umgrenzten Strukturen ließen sich die verschiedenen Längenmaße, Flächen und Volumina der beiden SCN ermitteln. Beide Kerne hatten eine anterior-posteriore Ausdehnung von 615 µm. Der SCN ipsilateral zur Enukleation hatte mit 360 µm seine größte medio-laterale und mit 330 µm seine größte ventro-dorsale Ausdehnung. Bei dem contralateral zur Enukleation gelegenen Kern betrugen die entsprechenden Maße 330 bzw.240 µm.

Anschließend wurde in jedem Schnitt der Serie der Flächeninhalt von SCN_{ext} und SCN_{int} bestimmt. Die nachfolgende Graphik (Abb. 15) zeigt die Entwicklung dieser Flächen im anterior-posterioren Verlauf.

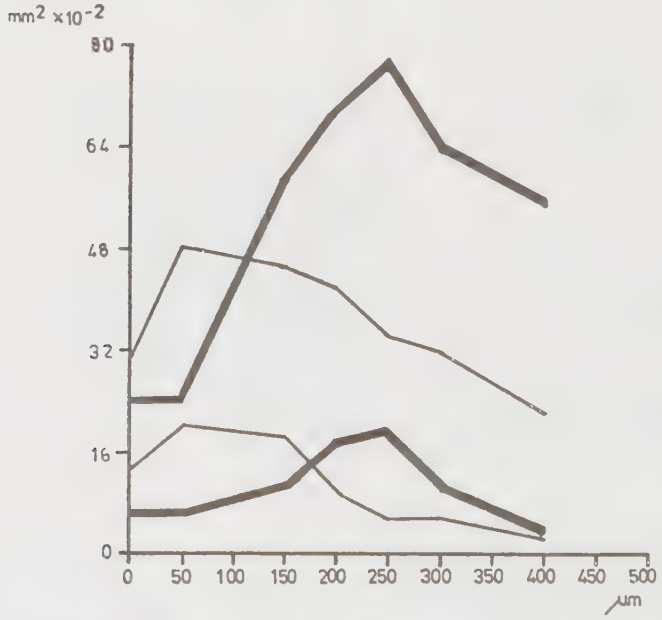


Abb. 15 Diagramm der Flächenwerte der in Abb. 14 gezeigten Frontalschnittserie einer enukleierten Ratte. Die Flächenwerte des ipsilateral zur Enukleation gelegenen SCN sind durch die stark ausgezogenen Kurven repräsentiert.

Für das hier gezeigte Tier ergaben sich durch Integration der Flächenverteilungskurve folgende Näherungswerte für die Volumina der SCN:

Ipsilateral	SCN_{ext}	$V = 0{,}022\ mm^3$
	SCN_{int}	$V = 0{,}0042\ mm^3$
Contralateral	SCN_{ext}	$V = 0{,}015\ mm^3$
	SCN_{int}	$V = 0{,}0045\ mm^3$

Es zeigte sich also, daß die SCN_{int} auf beiden Seiten annähernd gleiche Volumina aufwiesen, während der SCN_{ext} contralateral zur Enukleation um 30% kleiner als der SCN_{ext} ipsilateral war. Eine Atrophie des SCN_{ext} war somit auf der Seite contralateral zur Enukleation anzunehmen.

3.1.2 Kombination der AO-Färbung mit anderen histologischen Verfahren

Die Fluoreszenz AO-gefärbter Schnitte konnte durch längere Beleuchtung mit UV-Licht vollkommen ausgebleicht werden. Ein Teil dieser Schnitte wurde dem Feulgen-Verfahren unterworfen. Die qualitativen und quantitativen Färbeergebnisse entsprachen denen der früher durchgeführten Feulgen-Färbungen und unterschieden sich nicht von mitgeführten unbehandelten Schnitten.

Ein anderer Teil der ausgebleichten Schnitte wurde in der Nissl-Färbung mit CV und in der Markscheidenfärbung mit Luxol-Fast-Blue behandelt. Dabei zeigte sich, daß der Ausfall dieser Färbungen von der vorangehenden AO-Fluorochromierung unbeeinflußt blieb.

Autoradiographische Schnitte färbten sich im AO-Färbebad in der üblichen beschriebenen Art. Eine Anfärbung der Fotoemulsion oder von Aggregationen der Silberkörner war nicht zu beobachten. So konnte im Auflicht das Silberkorn-Bild und durch Umschalten auf die Fluoreszenzanregung das histologische Bild der AO-Färbung betrachtet werden.

Eine vorhergehende AO-Färbung erwies sich als kompatibel mit nachfolgenden Immunperoxydase-Verfahren.

3.1.3 Stereologische Darstellung der ASC

Die histologischen Strukturen sollten zusätzlich zur reinen Abgrenzung und nach der morphometrischen Analyse zu einer drei-dimensionalen Rekonstruktion zusammengefügt werden. Diese Rekonstruktion wurde von L. TECKHAUS am Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund, erstellt. Da die mit einer 5x5 Matrix vorgeglätteten Isolinien für dieses Computerprogramm nicht unmodifiziert verwendet werden konnten, mußten sie nach dem oben angegebenen Verfahren (s. 3.1.1.2) geglättet werden.

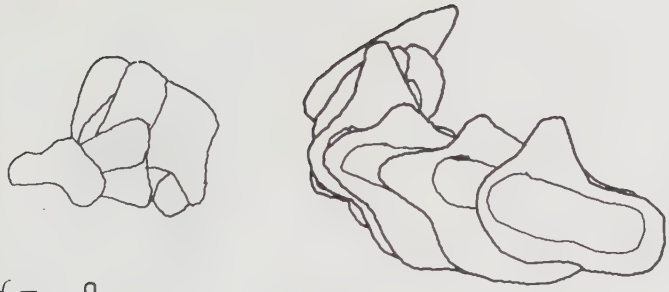
Das Modell der Rekonstruktion sollte nach Abgrenzung der Kerngebiete die Integration weiterer Befunde ermöglichen. Beispielsweise sollte es möglich sein, einzelne Zellen nach bestimmten Kriterien zu identifizieren und in die Rekonstruktion zu übernehmen.

Bei der Untersuchung der ASC fiel auf, daß sich im Chiasma opticum zwischen den Nuclei suprachiasmatici und unterhalb des III. Ventrikels eine größere Anzahl Neurone befand. Diese lagen teils einzeln, teils gruppiert angeordnet und waren deutlich von der Oligodendroglia zu unterscheiden. Die Größe dieser Zellen variierte zwischen 8 und 15 µm; es fanden sich auch magnozelluläre Anteile, deren Längsachse sich nach lateral orientierte.

Die Häufigkeit der Zellen nahm vom anterioren zum posterioren Pol des SCN zu. Dabei entfernte sich die Gruppierung von der subventrikulären Lage in Richtung auf die ventrale piale Oberfläche des Chiasma opticum.

Die hier beschriebenen Einzelzellen wurden zusammen mit den bereits in Abb. 14 gezeigten Abgrenzungslinien für den III. Ventrikel, die piale Oberfläche und die SCN_{ext} und SCN_{int} zur Rekonstruktion gebracht. Jeder der dargestellten Parameter konnte durch eine eigene Kodierung einzeln für die Rekonstruktion abgerufen werden.

a



$\alpha = 0$
$\beta = -15$
$\gamma = 20$

b

$\alpha = 0$
$\beta = -15$
$\gamma = 20$

Abb. 16 Dreidimensionale Darstellung der SCN:
a) zeigt rechts sowohl den SCN_{ext} als auch den SCN_{int}, links wurde der Übersichtlichkeit halber nur der SCN_{int} dargestellt.
b) zeigt die Lage der beiden Kerne zum III. Ventrikel.

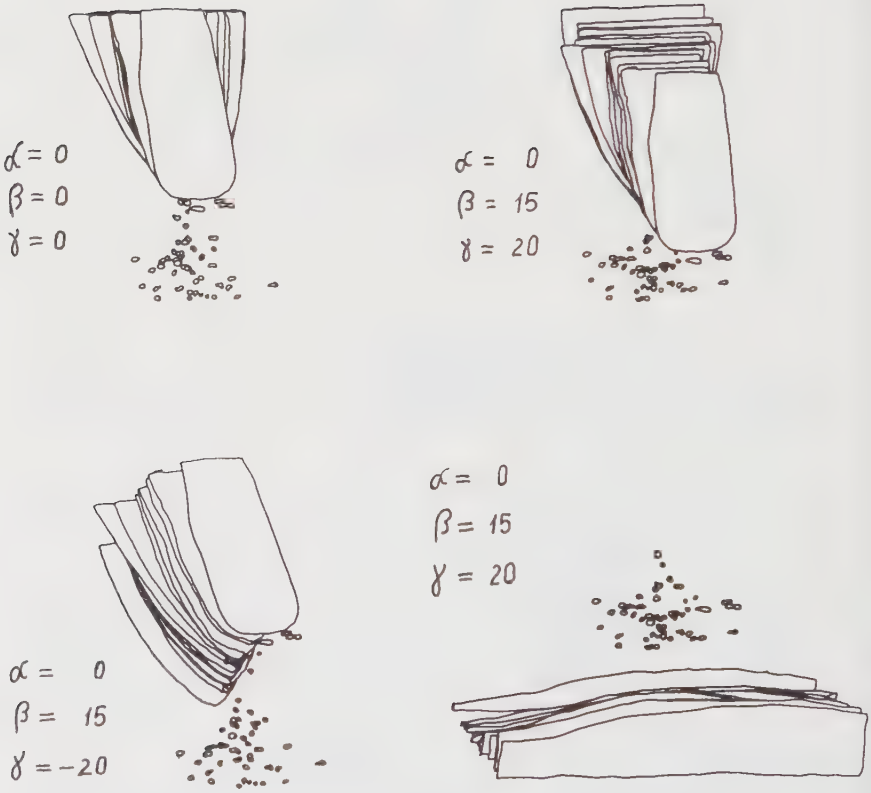


Abb. 17: Einzeln kodierte Nervenzellen der ASC in ihrer Beziehung zu III. Ventrikel und pialer Oberfläche unter verschiedenen Blickwinkeln.

In Abb. 16 wird eine Rekonstruktion der Nuclei suprachiasmatici und ihrer Lage zum III. Ventrikel gezeigt. Die Abb. 17 zeigt eine stereologische Darstellung der Einzelzellen und ihre Beziehung zum III. Ventrikel und der pialen Oberfläche.

3.2 CV

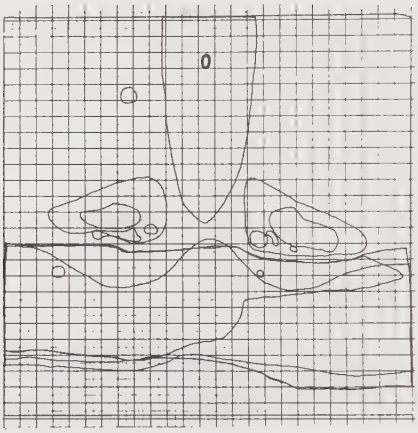
3.2.1 Morphometrie

3.2.1.1 Meßwertverteilungen und Auswahl der Isolinien

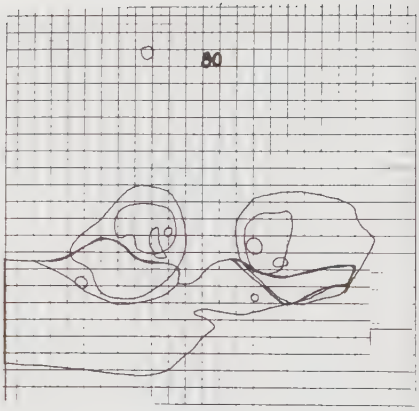
Die Festlegung der Schwellenwerte der Isolinien für Ventrikel, piale Oberfläche und die beiden Kernteile erfolgte anhand der Meßwertverteilungen analog dem bei AO (3.1.1.1) beschriebenen Verfahren. Da die CV-Färbung von Schnitt zu Schnitt eine unterschiedliche Tingierung zeigte, mußten erwartungsgemäß die Schwellen der Isolinien jeweils neu bestimmt werden. Ventrikel und piale Oberfläche ließen sich durch den Wert 300 in allen Schnitten abgrenzen. Dagegen schwankte die äußere Grenze für den SCN zwischen 600 und 1000 und streute damit um 25% um den mittleren Wert von 785.

3.2.1.2 Darstellung der ASC mit Isolinien

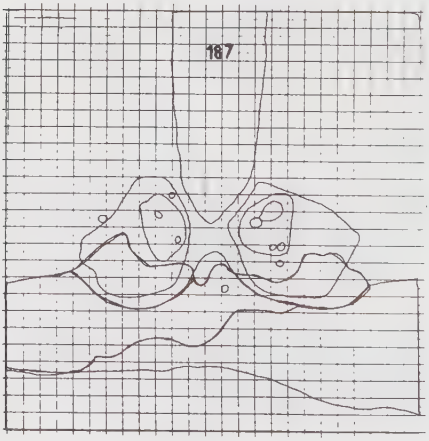
Nach der Glättung mit der Matrix 5x5 ergab sich bei der hier nötigen und bei jedem Schnitt anderen Auswahl der Isolinien eine Abgrenzung von Ventrikel, pialer Oberfläche sowie von SCN_{ext} und SCN_{int}.
In Abb. 18 sind die geglätteten Computerausdrucke der ASC einer CV-gefärbten Schnittserie mit den planimetrisch bestimmten Flächenwerten für den SCN_{ext} und SCN_{int} dargestellt.



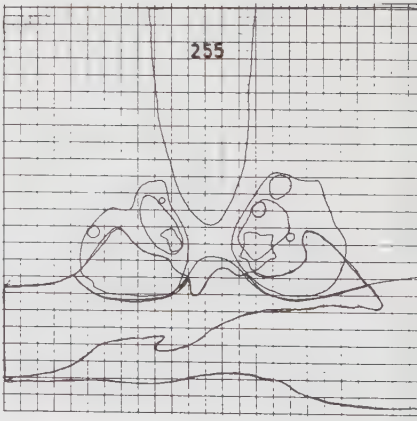
SCN_{ext}	33	36
SCN_{int}	7	11



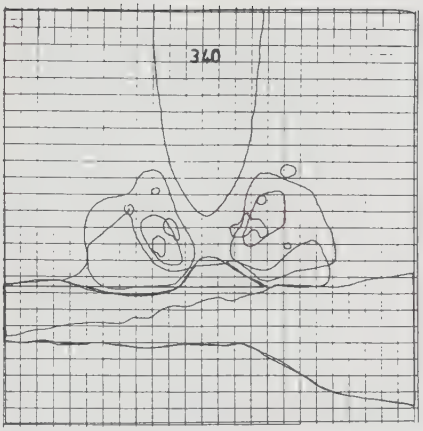
SCN_{ext}	50	64
SCN_{int}	13	13



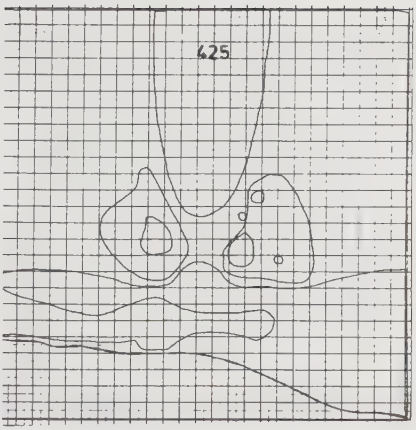
SCN_{ext}	53	59
SCN_{int}	12	14



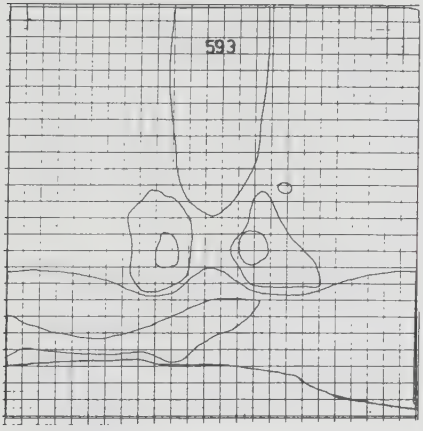
SCN_{ext}	51	57
SCN_{int}	9	12



SCN_{ext}	54	47
SCN_{int}	7	9



SCN_{ext}	36	42
SCN_{int}	5	4



SCN_{ext}	19	35
SCN_{int}	4	5

Abb. 18 Geglättete Computerausdrucke der ASC zusammen mit den planimetrisch bestimmten Flächenmaßen (Werte in $mm^2 \times 10^{-2}$) für den SCN_{ext} und SCN_{int}. Hier finde sich bereits die Abgrenzungslinien der autoradiographischen Markierungsfelder. Dabei sind inselförmige Areale der Markierun im Bereich des SCN_{int} schraffiert dargestellt; zusätzlich einige Gefäße.

3.2.1.3 Morphometrische Befunde des SCN

Aus den umgrenzten Strukturen ergaben sich durch Planimetrie die verschiedenen Maße der SCN. Auf beiden Seiten hatte der SCN eine anterior-posteriore Ausdehnung von 650 µm, einen maximalen medio-lateralen Durchmesser von 330 µm und eine ventro-dorsale Ausdehnung von 315 µm.

Bei diesem Tier ergaben sich für den SCN folgende Kernvolumina:

links	SCN_{ext}	$V = 0{,}022\ mm^3$
	SCN_{int}	$V = 0{,}0045\ mm^3$
rechts	SCN_{ext}	$V = 0{,}025\ mm^3$
	SCN_{int}	$V = 0{,}005\ mm^3$

3.2.2 Kombinierbarkeit der CV-Färbung mit anderen histologischen Verfahren

Autoradiographisch behandelte Schnitte wurden mit CV nachgefärbt. So konnten die Silberkörner reflektionsphotometrisch gemessen werden, anschließend war die Transmissionsphotometrie an den CV-gefärbten Schnitten möglich. Wurden CV-Schnitte mit Luxol-Fast-Blue oder einer Kombination von Luxol-Fast-Blue mit einer Golgi-Methode ('Triple-stain') nachgefärbt, so war in dem dann entstehenden kontrastreichen Bild eine subjektive Differenzierung möglich, nicht jedoch eine automatische Analyse der verschiedenen Färbungen.

3.2.3 Rekonstruktion der ASC unter Integration autoradiographischer Befunde

Wie unter 3.1.1.1 erläutert, mußten die Isolinien für eine weitere Bearbeitung zusätzlich geglättet werden.

An diesem Tier sollte gezeigt werden, wie in das bestehende Modell der Zytoarchitektonik zusätzliche Untersuchungen über die Fibroarchitektonik integriert werden konnten. Nach Abgrenzung von SCN_{ext} und SCN_{int} mittels Isolinien wurde eine Analyse der retinalen Afferenzen durchgeführt.

Dazu wurde die Silberkorn-Verteilung der autoradiographisch behandelten Schnitte ausgewertet und als Isolinie ausgedruckt. Diese Isolinien umgrenzten die autoradiographisch markierten Bereiche im Chiasma opticum und im SCN. Am unten dargestellten Schnitt wird gezeigt, wie das geglättete Abgrenzungsbild für den SCN (hier mit 4 Gefäßen) mit den Isolinien der Silberkorn-Verteilung überlagert wird (Abb. 19).

Für die dreidimensionale Rekonstruktion wurden folgende Parameter berücksichtigt: Ventrikel und piale Oberfläche, Unter- und Oberkante des Chiasma opticum, große Gefäße, Abrenzungslinien für den SCN_{ext} und SCN_{int} und Abgrenzungslinien für die autoradiographisch markierten Bereiche. Für die Rekonstruktion konnten die einzelnen kodierten Parameter in verschiedenen Kombinationen gewählt und unter verschiedenen Blickwinkeln gezeichnet werden.

Die nachfolgende Abb. 20 zeigt die räumliche Ausdehnung der beiden SCN (a) und die komplexen Beziehungen zwischen den Kernen, dem Chiasma opticum und den optischen Fasern (b, c). Um die Beziehung der einzelnen Kernteile zu den afferenten Fasern besser erkennbar zu machen, wurde in Abb. 20b neben dem gesamten rechten SCN (ipsilateral zur Injektion) lediglich der linke SCN_{int} (contralateral) dargestellt. Umgekehrt zeigt die Abb. 20 c den gesamten linken SCN neben dem rechten SCN_{int}, jetzt aus anderem Blickwinkel. Diese stereologischen Darstellungen lassen erkennen, wie die inneren Kernanteile (SCN_{int}) von der Mehrheit der afferenten Fasern nicht berührt werden. Lediglich eine kleine Anzahl dieser Fasern stellt sich auf den Einzeldarstellungen (Abb. 18) als kleine markierte Inseln dar, die den Bereich der SCN_{int} überlagerten.

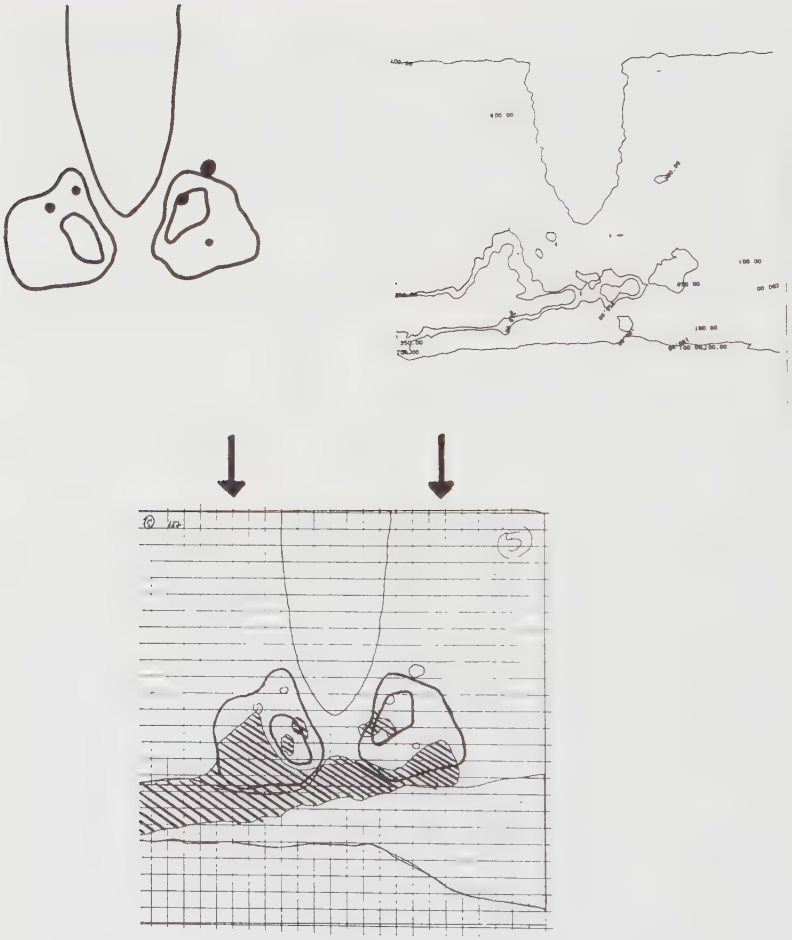


Abb. 19: Darstellung von Zyto- und Fibroarchitektonik in ihrer Überlagerung an einem Schnitt.

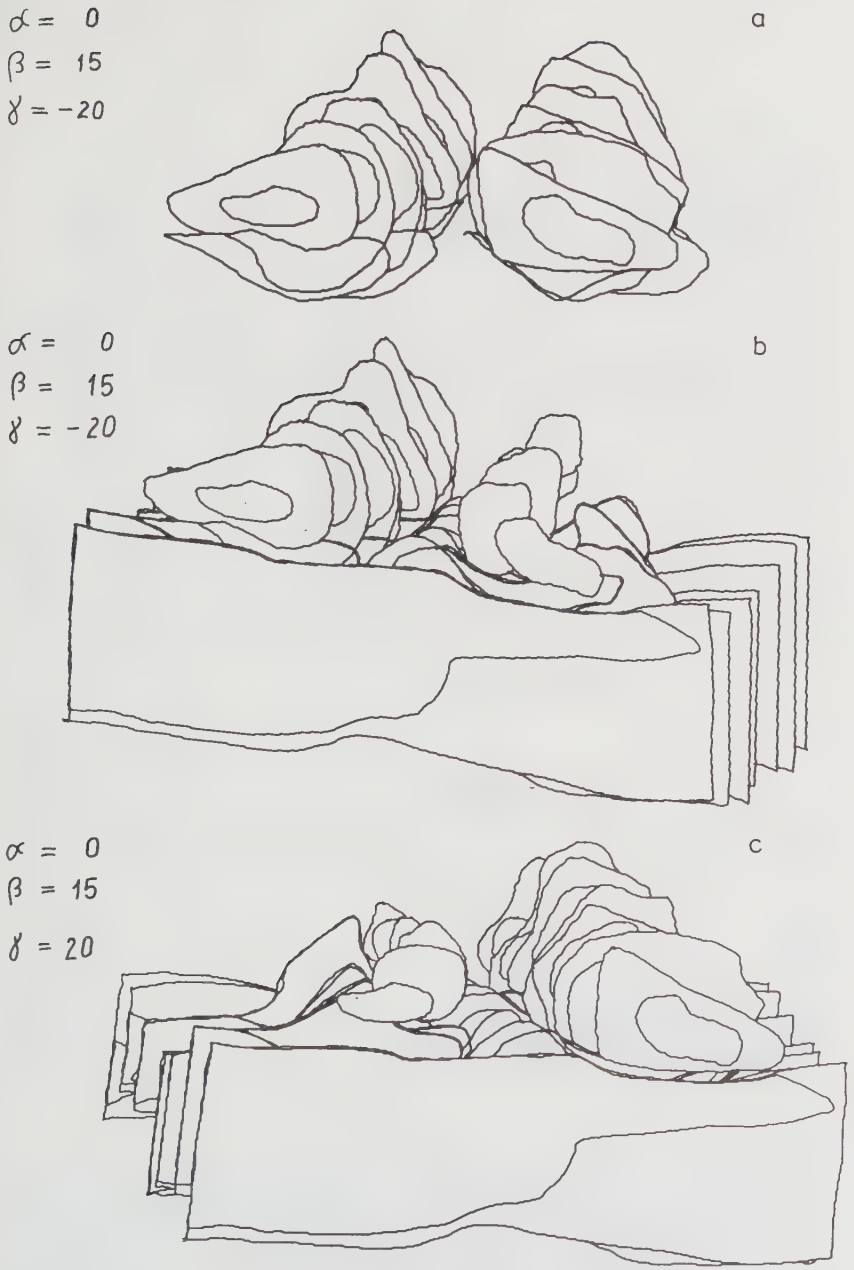


Abb. 20: Stereologische Darstellung der beiden SCN (a, b, c) und der retinalen Afferenzen (b, c).

4. Grauwertmessung

Im AO-Schnitt zeigt die Grauwertanalyse verschiedener Einzelstrukturen mit dem I.B.A.S. in den entstandenen Verteilungshistogrammen deutlich abgegrenzte Gipfel (s. Abb. 21): absoluter Hintergrund (Ventrikel, Blutgefäß) 40-60, Neuropil 80-100 mit einem Maximum bei 90, Cortexzelle 90-255 mit Maxima bei 125-140 und bei 245-255. Diese Gipfel fanden sich in der Grauwertverteilung verschiedener histologischer Areale (Ventrikel, Chiasma opticum, Area lateral des SCN, SCN) wieder (Abb. 22a). Neben dem Gipfel für das Neuropil bei 90 ließ sich in zellreichen Arealen (Area lateral des SCN, SCN) um 135 ein zweiter Gipfel ausmachen. Dieser zweite Gipfel deckte sich mit dem der Nervenzelle (Abb. 21).

Eine Analyse der gleichen Strukturen im Nissl-Bild (Abb.22b) zeigte eine relativ kontinuierliche Grauwertverteilung mit nur einem Gipfel, aus der sich Areale mit hoher Nervenzelldichte (SCN) nicht abhoben.

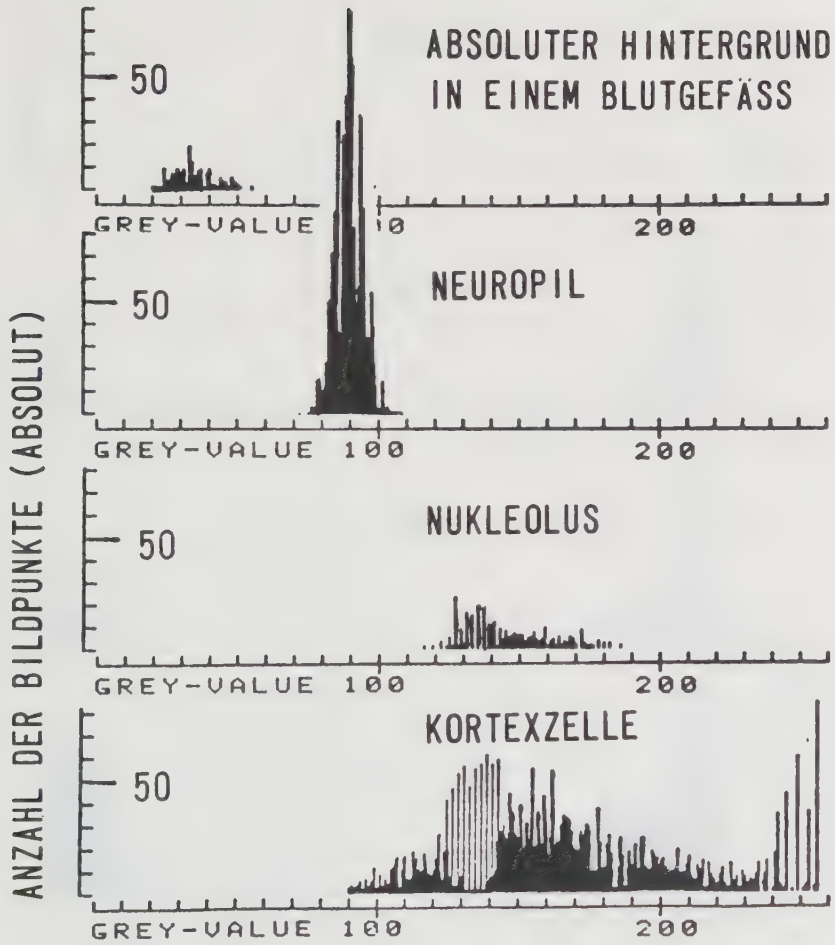


Abb. 21: Grauwertverteilung verschiedener Einzelstrukturen im AO-gefärbten Schnitt. Die Grauwerte wurden mit dem I.B.A.S. bei einer Gesamtvergrößerung von x400 gemessen. Auf der Abszisse sind die Grauwerte ('grey-value') entsprechend der internen Norm des Gerätes von 0 bis 260 aufgetragen; auf der Ordinate erscheint die absolute Häufigkeit der Bildpunkte. Die genannten Objekte wurden unter Bildschirmkontrolle genau eingegrenzt.

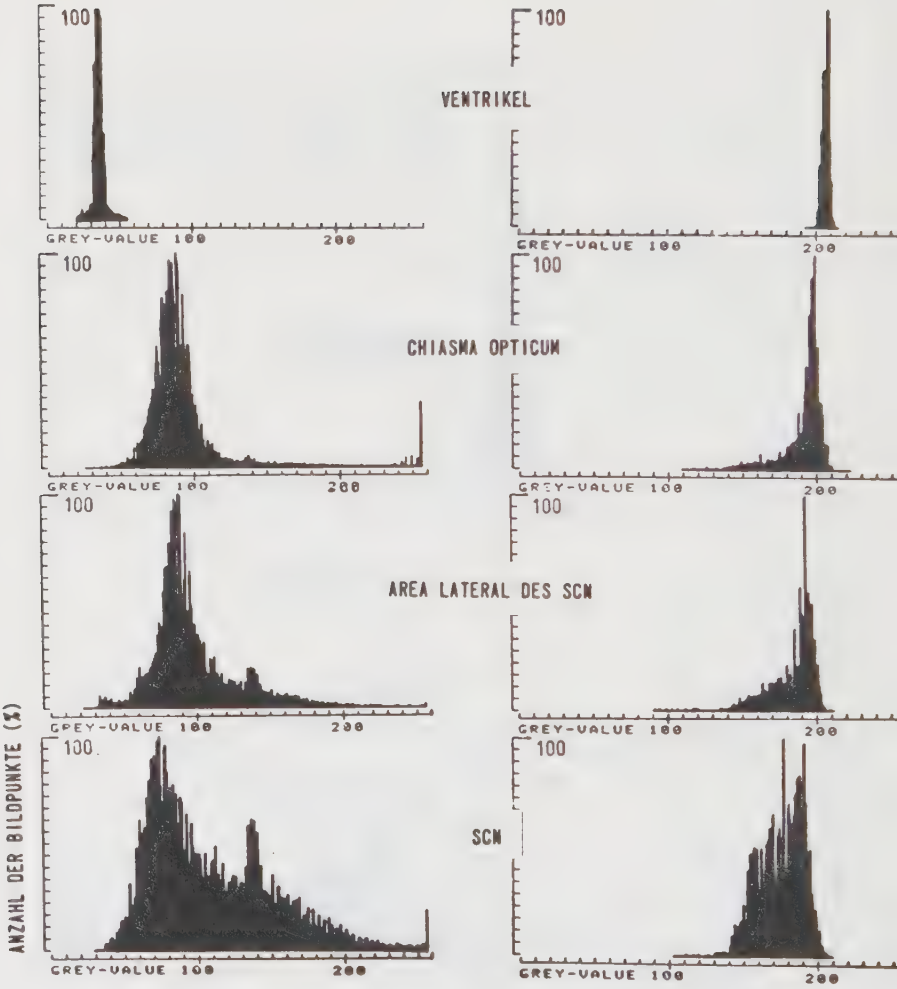


Abb. 22: Grauwertverteilung verschiedener histologischer Areale. Grauwertmessungen mit dem I.B.A.S. zum Vergleich der AO-Färbung (LINKS) mit der CV-Färbung (RECHTS). Gesamtvergrößerung x400. Die Abszisse gibt die Grauwerte entsprechend der internen Gerätenorm von 0 bis 260 wieder; auf der Ordinate erscheint die relative Anzahl der Bildpunkte.

Diskussion

Nach RUCH und BOSSHADT (1963) sowie BÖHM (1972) bieten Fluoreszenztechniken in der Mikroskopie prinzipielle Vorteile gegenüber Durchlichttechniken:

a) Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen reichen wesentlich geringere Farbstoffmengen aus, um kontrastreiche Bilder zu erzielen.
b) Bei vielen Fluoreszenzfarbstoffen sind die histochemischen Mechanismen, insbesondere für ihre Bindung an Nukleinsäuren, weitgehend aufgeklärt.
c) Die Messung des vom angeregten Farbstoff emittierten Lichtes bietet aus physikalischen Gründen bei der photometrischen Bestimmung von Stoffmengen in biologischem Material deutliche Vorteile gegenüber Durchlicht-Absorptionstechniken, so kann z.B. bei der Emissionsphotometrie die Meßfeldgröße relativ groß gewählt werden, wohingegen bei Absorptionsmessungen aus physikalischen Gründen eine Zerlegung in sehr kleine Meßareale nötig ist.

   Auf diese Weise werden quantitative Untersuchungen z.B. auf den Nukleinsäuregehalt wesentlich erleichtert.

Fluoreszenztechniken und die photometrische Bestimmung der Fluoreszenzlichtmenge (Fluorometrie) finden breite Anwendung bei der Messung des Nukleinsäuregehaltes von Einzelzellen (Zytofluorometrie). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Vorteile der Fluoreszenzmethoden auch für eine Auswertung von Schnittpräparaten genutzt werden konnten. Mit dem Fluorochrom Acridin-Orange (AO) gelang es, eine Fluoreszenzfärbung für Hirnschnittmaterial zu entwickeln, die die Anforderungen einer automatischen Analyse der Zytoarchitektonik in einem "Scanning"-Photometersystem erfüllte. Die quantitative Beziehung von AO zu Nukleinsäuren wurde bei der Messung AO-gefärbter Schnitte dahin-

gehend ausgenutzt, daß aus den gewonnenen Photometer-Daten durch Computerbearbeitung Abgrenzungslinien für die Zytoarchitektonik ermittelt wurden, die als Grundlage für morphometrische Auswertungen dienten. Anschließend konnte unter Verwendung dieser Linien eine dreidimensionale, stereologische Darstellung einer AO-gefärbten Schnittserie durchgeführt werden.

Die Adaptierung der für die Zytologie unproblematischen Methodik für die Analyse von Hirnschnitten stößt jedoch auf eine Reihe von Einwänden, die gegen eine kritiklose Übernahme der bestehenden Methodik und hieraus resultierender quantitativer Ableitungen sprechen.

Unter diesem Bezug müssen vier Punkte diskutiert werden:

1. Methodische Anforderungen an Präparation und Färbung,
2. Nachweis der Gültigkeit der fünf genannten Kriterien am Schnittpräparat,
3. Instrumentelle Bedingungen,
4. Bezug zur Morphometrie und Stereologie.

1. Präparation und Färbung

Als gut geeignet für die Fixierung der AO-Schnittpräparate erwies sich eine Formalin-Fixierung. Sie erzeugte im nativen Schnitt nur eine geringe Eigenfluoreszenz und ermöglichte daher die hohen Kontraste des AO-Bildes. Die Bouin-Fixierung mit Pikrinsäure dagegen erwies sich als ungeeignet, da hier eine deutlich höhere Eigenfluoreszenz resultierte, die dem Gelb der reinen Pikrinsäure entsprach. Seit den Untersuchungen STOCKINGERs (1951) ist die Eigenfluoreszenz Formalin-fixierter Schnitte bekannt. Doch ist diese im Vergleich zu anderen Methoden so gering, daß ROMEIS (1968) diese Fixierung für Fluoreszenzfärbungen empfiehlt. SAURER (1969) geht sogar soweit, die Formalin-Fixierung als Referenzmethode bei quantitativen Studien

an Fluoreszenzmaterial zu fordern. KATER und NICHOLSON (1973) weisen ausdrücklich auf die besondere Eignung der Formalin-Fixierung für Nervengewebe hin. Für die Fluoreszenztechnik mit Procion-Yellow testeten sie verschiedene Fixierungen und fanden bei der Formalin-Fixierung die geringste Eigenfluoreszenz bei gleichzeitig bestmöglichem Färbeergebnis. Auch unter dem Aspekt der Kombinierbarkeit histologischer Methoden bietet die Formalin-Fixierung gute Voraussetzungen, da alle organischen Zellelemente erhalten bleiben (ARNOLD, 1968). Auch für alle anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Färbungen (CV, Luxol-Fast-Blue, Immunperoxydase-Verfahren und Feulgen-Färbung) brachte die Formalin-Fixierung gute Ergebnisse.

Ein weiterer Punkt, der die Qualität des Fluoreszenzbildes ganz erheblich beeinflußt, ist die Schnittdicke. Sie darf nicht zu groß gewählt werden, damit keine Reabsorption und Streuung des emittierten Lichtes im Schnitt selbst erfolgt (RIGLER, 1966).

Im Hinblick auf die günstigsten Werte von Reabsorption und Streuung muß bei der Photometrie emittierten Lichtes neben der Schnittdicke auch die numerische Apertur des Meßobjektives in Betracht gezogen werden (RUCH, 1970). Nach diesem Autor ergibt sich für die Auflichtfluoreszenz eine optimale Schnittdicke von 6 µm bei einer numerischen Apertur von 1,3. In dieser Arbeit wurde eine Schnittdicke von 5 µm bei einer numerischen Apertur von 1,25 gewählt, so daß der Empfehlung von RUCH weitgehend entsprochen wurde. Die Untersuchung fluorochromierter 20 µm dicker Schnitte ergab erwartungsgemäß wesentlich schlechter kontrastierte Bilder, so daß für die endgültige Auswertung nur 5 µm Schnitte angefertigt wurden.

Unter Verwendung von 5 µm dicken, Formalin-fixierten Hirnschnitten wurde dann eine AO-Färbung entsprechend den Anforderungen einer automatischen, morphometrischen Analyse entwickelt.

Als optimales Färbeverfahren erwies sich eine 30-minütige Färbung in 1:50 000 verdünnter und mit dem Glyzin-HCl-Puffer nach SÖRENSEN auf einen pH von 1,2 eingestellter AO-Lösung (TEFETT, SCHMIDT-KASTNER und MAI, 1981).

Aus diesem Färbeschema resultierte eine gelb-orange Färbung des Zytoplasmas, eine gelb-grüne Darstellung des Kernes und eine Grünfärbung des Nukleolus. Das Zellbild der AO-Färbung und die Differenzierbarkeit der verschiedenen zellulären Strukturen entspricht weitgehend dem eines guten Nissl-Bildes. Darüberhinaus erlaubt die Farbigkeit des AO-Bildes eine zusätzliche Beurteilung und Differenzierung von Zellelementen und Zelltypen. Qualitative Bilder der AO-Fluorochromierung von Hirnschnitten sind seit den Untersuchungen von KRIEG (1953) sowie SCHÜMMELFEDER, KROGH und EBSCHNER (1958) bekannt. KRIEG beschrieb kupferrot leuchtende Nissl-Schollen, gelbe Kerne und gelbe Nukleolen, ohne allerdings sein genaues Färbeverfahren und die technischen Details seiner Fluoreszenzbedingungen, insbesondere Anregungs- und Sperrfilter, anzugeben.

SCHÜMMELFEDER et al. (1958) diskutierten die starke Abhängigkeit des Färbeergebnisses vom pH-Bereich. Diese Abhängigkeit unterschiedlicher Färbeergebnisse vom pH-Bereich und von der Verdünnung läßt sich aus den heute bekannten Bindungsmechanismen (elektrostatische Bindungen an die Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, Interkalierung zwischen die Basenpaare der Doppelhelix) erklären.

Bei Färbungen mit 1:50 000 verdünnter AO-Lösung traten sowohl grüne als auch gelb-orange gefärbte Zellelemente auf, Verdünnungen von 1:500 000 und darüber zeigten dagegen nur noch grüne Zellelemente. Es muß also bei der in dieser Arbeit gewählten AO-Verdünnung von 1:50 000 ein metachromatischer Effekt auftreten, der nach PEARSE (1972) auf die unterschiedliche Sekundärstruktur von DNS und RNS zurückzuführen ist. Weitere Angaben, die dieses bestätigen, fin-

den sich bei RIGLER (1966) sowie bei PRITCHARD, BLAKE und PEACOCKE (1966). Danach lagern sich die AO-Moleküle so in die doppelsträngige DNS-Kette ein, daß die Entfernung der einzelnen AO-Moleküle so groß wird, daß keine Interaktion der AO-Moleküle untereinander mehr stattfinden kann. In DNS-haltigen Zellelementen (Kern) resultiert die grüne Fluoreszenz des AO-Monomers. Binden sich AO-Moleküle dagegen an die einsträngige RNS, so werden sie fast an jede Phosphatgruppe der Nukleotidkette angelagert. Nun liegen die AO-Moleküle nahe genug zusammen, um Polymere zu bilden. Erwartungsgemäß entspricht die Verteilung beider Farbwerte im Schnittbild der Verteilung von DNS und RNS in Perikaryon und Glia.

Die Tatsache, daß bei hohen Verdünnungen von über 1:500 000 ausschließlich grüne Farbwerte beobachtet werden, läßt sich damit erklären, daß nun zu wenig AO-Moleküle zur Polymerbildung zur Verfügung stehen. Weitergehende Untersuchungen über die Abhängigkeit des metachromatischen Effektes von den AO- und DNS-Konzentrationen führten NICOLINI et al. (1979) an Einzelzellen durch. Bei bestimmten Werten des Quotienten μ mol AO / μ mol DNS trat ein metachromatischer Effekt auf, der von diesen Untersuchern zur automatischen Zelldifferenzierung genutzt wurde. Wenngleich eine derart exakte Nukleinsäurebestimmung im Schnitt nicht möglich ist, kann nach unseren Beobachtungen davon ausgegangen werden, daß der metachromatische Effekt bei Verdünnung zwischen 1:100 000 und 1:500 000 auftritt.

Die Verwendung von AO für Schnittfärbungen bei einer Verdünnung von 1:50 000 wird durch quantitative zytofluorometrische Untersuchungen gestützt. Als optimale AO-Konzentration wurde von RIGLER (1966) $1x10^{-4}$ mol/l, von GOLDEN und WEST (1974) maximal $5x10^{-5}$ mol/l, von TRAGANOS et al. (1977) $4x10^{-5}$ mol/l sowie von BAUER und DETHLEFSEN (1980) maximal $2,8x10^{-5}$ mol/l angegeben. Die hier gewählte Ver-

dünnung von 1:50 000 entspricht einer AO-Konzentration von $7{,}7 \times 10^{-5}$ mol/l und liegt somit in der gleichen Größenordnung.

Bei der AO-Färbung am Schnittpräparat muß neben der spezifischen auch die unspezifische AO-Bindung sowie die Eigenfluoreszenz der Proteine und deren Anteil an der dunkelgrünen Fluoreszenz des Neuropils diskutiert werden. Nach RUCH (1972) und SAURER (1966) könnte diese Hintergrundfluoreszenz auf die nach ihrer Ansicht immer auftretende Eigenfluoreszenz von Proteinen zurückgeführt werden. Außerdem ist eine Bindung von AO an die anionischen Gruppen von sauren Mukopolysacchariden bekannt (PEARSE, 1960). Nach SCHÜMMELFEDER et al (1958) sowie KIERNAN und BERRY (1975) kommen diese jedoch im ZNS nur in so geringen Mengen vor, daß ihre Fluoreszenz die der gefärbten Nukleinsäuren kaum überlagert. Bei TRAGANOS et al. (1977) findet sich außerdem der Hinweis, daß Kationen wie Na^+ im Überschuß mit AO um die anionischen Bindungsstellen der Proteine und Mukopolysaccharide konkurrieren. Diese Untersucher geben an, daß eine NaCl-Konzentration von 0,1-0,15 mol/l ausreicht, um diese anionischen Bindungsstellen abzudecken und eine spezifische Anfärbung der Nukleinsäuren mit AO zu erzielen. In der hier verwendeten Pufferlösung befanden sich Na^+-Kationen in einer Konzentration von 0,1 mol/l, so daß es über den beschriebenen Mechanismus zu einer spezifischen Anfärbung allein der Nukleinsäuren gekommen sein dürfte.

2. Fünf Kriterien

Ziel dieser Arbeit war, mit der entwickelten Fluoreszenzfärbung Hirnschnitte zu färben und mittels eines "Scanning"-Photometers einer automatischen morphometrischen Auswertung zu unterziehen. Die Eignung für diese automatische Auswertung konnte anhand der fünf in der Einleitung genannten

Kriterien überprüft werden. Dazu wurden in verschiedenen Hirnarealen (Cortex, Kleinhirn, Hypothalamus) zytophotometrische Messungen vorgenommen.

Konstanz und Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse zeigten, daß auch die AO-Färbung im Schnittpräparat eine hohe KONSTANZ (1) und REPRODUZIERBARKEIT (2) aufwies, wie sich aus der Anwendung von AO für die Zytofluorometrie erwarten ließ (TRAGANOS et al., 1977; NICOLINI et al., 1979; GOLDEN und WEST, 1974). Voraussetzungen hierfür waren neben konstanten histologischen auch kontrollierte meßtechnische Bedingungen (siehe Abschnitt 3).

Die Konstanz wird durch das Ausbleichen, das alle Fluoreszenzfarbstoffe zeigen, eingeschränkt. Nach BÖHM (1972) sind für dieses Ausbleichen zwei Mechanismen bekannt. Photoreduktion als ein Mechanismus tritt dort auf, wo Farbstoffe an Polymere gebunden sind und ein metastabiles Triplett bilden. Je höher die Farbstoffbindung ist, um so mehr Photoreduktion tritt ein. Zum anderen kommt es durch Photooxidation zu einer irreversiblen Zerlegung des Farbstoffs in meist farblose Reaktionsprodukte. Die genauen Zusammenhänge dieser Reaktionen sind nicht bekannt und eine Aussage darüber, wie ein Fluoreszenzfarbstoff in einer bestimmten Bindung ausbleicht, ist nicht möglich. So muß das Ausbleichverhalten bei jedem Farbstoff, bei jedem histologischen Material und unter den verschiedenen Anregungsbedingungen untersucht werden. Für eine AO-Färbung von Schnittmaterial lagen hierzu keine Daten vor. Daher wurde zytophotometrisch eine Ausbleichkurve ermittelt, die einen logarithmischen Abfall der Fluoreszenzintensität (mit einem Abfall auf 90% nach 22 sec.) zeigte. Vergleicht man die Zeitspanne, nach der bei AO-Präparaten 75% der Ausgangsfluoreszenz erreicht sind (115 sec.), mit Angaben in der Literatur (BÖHM, 1972; RUCH, 1970), so findet man für BAO

und Pararosanilin Werte von 60 sec., für Acridin-Gelb einen Wert von 10 sec.. AO zeigt somit im Vergleich zu den anderen hier genannten Fluoreszenzfarbstoffen eine hohe Stabilität und damit eine relativ gute Konstanz.

Eine Beeinflussung der Meßgenauigkeit durch den Ausbleichfehler kann bei Verwendung automatischer "Scanning"-Systeme wegen der konstanten Anregungsbedingungen negiert werden (siehe Abschnitt 3).

Konstanz und Reproduzierbarkeit der AO-Färbung entsprechen der Feulgen-Färbung. Beide Fluoreszenzmethoden sind damit der CV-Färbung deutlich überlegen, da hier das Färbeergebnis relativ großen Schwankungen unterliegt (ADHAMI, 1973), wobei berücksichtigt ist, daß die Schwankungsbreite der Feulgen-Farbstoffe nach MATZKE et al. (1979) bei 30% liegt.

Spezifität

Eine SPEZIFITÄT (3) von AO für die Nukleinsäuren DNS und RNS liegt nach den bereits in der Einleitung zitierten Arbeiten zum Bindungsverhalten von AO (STEINER und BEERS, 1959; LOESER et al., 1960; LERMAN, 1961; RIGLER, 1966; PRITCHARD et al., 1966; PEARSE, 1972) vor. Wie bereits weiter oben diskutiert, stellten sich im Hirnschnitt nahezu ausschließlich die nukleinsäurehaltigen Strukturen von Zytoplasma, Kern und Nukleolus dar, so daß auch für die hier entwickelte Färbung eine weitgehende Spezifität anzunehmen ist.

AO besitzt damit zwar nicht ganz diese hohe Spezifität,wie sie bei Feulgen-Farbstoffen für DNS gesichert ist (RUCH, 1970; BÖHM, 1972), ist den Nissl-Farbstoffen aber deutlich überlegen, da bei diesen ein exakter Reaktionsmechanismus nicht bekannt ist, und das färberische Verhalten nicht kalkulierbar ist.

Kontrast

Der KONTRAST (4) ergibt sich im AO-gefärbten Schnitt zwischen den AO-markierten Nukleinsäuren der Zellen und dem Hintergrund. Entscheidend für die hohen Kontraste war zum einen die hohe Zellfluoreszenz, die durch das angegebene Verfahren erreicht wurde. Zum anderen galt es, die Hintergrundfluoreszenz möglichst niedrig zu halten. Neben den bereits aufgeführten Faktoren der Eigenfluoreszenz von Proteinen des Neuropils und einer ganz geringen Anfärbung sonstiger Strukturen sind nach BÖHM (1972) drei Faktoren für den Hintergrund verantwortlich zu machen.

a) Eigenfluoreszenz des Glases, des Immersionsöls, der Objektivlinsen und Sperrfilter: Diese Faktoren konnten durch Verwendung eines speziellen Immersionsöls sowie geeigneter Objektive und Sperrfilter niedrig gehalten werden.

b) Eine unspezifische Farbstoffbindung an den Objektträger: Sie konnte im Schnitt nur in Blutgefäßen und Ventrikel auftreten. Nach der angegebenen Wässerung von 2x5 Minuten waren nur noch minimale Farbstoffspuren in diesen Strukturen sichtbar, die nach kurzer Beleuchtungszeit sofort ausbleichten. Dieser Effekt, daß unspezifisch abgelagerter Farbstoff deutlich schneller wegbleicht als der chemisch gebundene, ist auch bei SANDRITTER und KRUG (1982) beschrieben.

c) Vertikal reflektiertes und durch den Sperrfilter gelangendes Anregungslicht: Durch Verwendung der eingebauten Anregungs- und Sperrfilterkombination (490 nm bzw. 515 nm) konnte dieser Faktor gering gehalten werden. Die Hintergrundfluoreszenz, die bei Anregung mit blauem Licht von 490 nm im dunkelgrünen Bereich lag, konnte, wie Messungen mit dem O.M.A. ergaben, durch einen zusätzlichen Sperrfilter von 580 nm so stark unterdrückt werden, daß sich eine Kontraststeigerung von 120% gegenüber der Verwendung eines 515 nm-Filters ergab. Unter diesen optimalen Bedingungen betrugen die Kontraste im

AO-Bild im Durchschnitt K = 0,6 bis K = 14,0. Die zytophotometrisch ermittelten Zellprofile zeigten dabei ein differenziertes Bild, in dem sich der Nukleolus deutlich von Kern und Zytoplasma abhob (siehe Ergebnisse, Abb. 8). In den nach der Feulgen-Reaktion mit BAO oder Pararosanilin gefärbten Schnitten lagen die Kontraste unter K = 2,0. Bei den CV-gefärbten Schnitten ergab sich im Durchlicht ein Kontrast von K = 0,5 bis K = 2,3. Sowohl bei Feulgen- als auch bei CV-Material waren dabei die Differenzierungen innerhalb der zytophotometrisch gewonnenen Zellprofile relativ gering. Damit lagen die Voraussetzungen dieser beiden Färbungen für eine automatische Auswertung deutlich schlechter als bei AO.

Ein weiterer Vorteil von AO gegenüber der Feulgen-Reaktion und der CV-Färbung lag in den qualitativen Kontrasten: Unterschiedliche Zellklassen ließen sich durch den Farbwert voneinander unterscheiden. So erlaubte beispielsweise der metachromatische Effekt die Unterscheidung von typischen großen Nervenzellen mit gelb-orangem Zytoplasma und grünem Nukleolus von den typischen homogen gelben Gliazellen. Durch Wahl geeigneter Sperrfilter konnte auf das Emissionsspektrum in der Weise Einfluß genommen werden, daß bestimmte Farbanteile und damit Zellelemente oder Zelltypen unterdrückt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß ein zunehmend dicker Sperrfilter die Gliazell-Fluoreszenz signifikant unterdrückt. Die Verwendung von automatischen Filterwechsel-Systemen oder eines Mikrospektrophotometers (siehe z.B. PLOEM, 1974) würde damit die Möglichkeit eröffnen, im AO-Bild Zellklassen über das Emissionsspektrum automatisch zu differenzieren.

Kombinierbarkeit

Um nach einer automatischen Auswertung der Zytoarchitektonik den Schnitt für weitere, möglichst automatisch auswertbare

Untersuchungen nutzen zu können, ist eine KOMBINIERBARKEIT (5) mit anderen Methoden unabdingbare Voraussetzung.

Bei der für die Darstellung der Zytoarchitektonik üblichen Nissl-Methode (z.B. mit CV) sind weitere Nachfärbungen zwar möglich, jedoch bleibt das ursprüngliche Nissl-Bild erhalten und stört so eine weitere automatische Auswertung. Bei der Feulgen-Methode kann die Fluoreszenz zwar ausgebleicht werden, so daß eine zweite Fluoreszenzfärbung nicht überlagert würde, jedoch ist hier der Schnitt durch die Säurehydrolyse stark zerstört, das Spektrum der möglichen Nachfolgefärbung also sehr begrenzt.

Demgegenüber wirkt die AO-Färbung nicht zerstörend auf den Schnitt und besitzt eine hohe Spezifität, die somit die nicht besetzten Bindungsstellen für nachfolgende histochemische Reaktionen freiläßt.

Es konnte gezeigt werden, daß im AO-gefärbten Schnitt sowohl die Nissl-Färbung mit CV als auch die Markscheidenfärbung mit Luxol-Fast-Blue in gewohnter Weise möglich waren. Die Anwendung der AO-Fluoreszenzmethode und ihrer Auswertung bedeutet also keinen Verzicht auf die herkömmliche Nissl-Methode zur Darstellung der Zytoarchitektonik. Da sich das AO-Präparat im Durchlicht ungefärbt zeigte, entfielen störende Überlagerungen mit diesen Farbstoffen, eine nachfolgende automatische Erfassung z.B. der Myeloarchitektonik war möglich.

Der bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen offensichtliche Nachteil des Ausbleichens erscheint unter dem Aspekt der Kombinierbarkeit mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen als Vorteil nutzbar. Bei Anwendung ausreichend starker und langer UV-Beleuchtung kommt es durch die oben genannten photochemischen Mechanismen zu einer kompletten Umwandlung der fluoreszierenden AO-Moleküle in farblose Reaktionsprodukte. Nach 12-stündiger Exposition unter eine

Labor-UV-Lampe konnte bei den AO-Schnitten die gesamte Fluoreszenz ausgelöscht werden. Damit wurde am selben Schnitt eine weitere Fluoreszenzfärbung möglich, wie hier für eine nachfolgende Feulgen-Färbung beispielhaft gezeigt wurde. Eine andere Möglichkeit der Kombination ergibt sich dann, wenn sich das Emissionsspektrum von AO von dem eines zweiten Fluorochroms durch Wahl geeigneter Sperrfilter trennen läßt. So erscheint eine Kombinationsfärbung mit den für Tracer-Untersuchungen verwendeten Stoffen 'True Blue', 'Bisbenzimid' und 'Nuclear Yellow' möglich, die alle im UV-Bereich angeregt werden, sowie eine Kombination mit immunhistochemischen Methoden unter Verwendung FITC-markierter Antikörper durchführbar.

Weitere Möglichkeiten resultieren daraus, daß nach autoradiographischer Behandlung des Schnittmaterials die AO-Färbung ungestört eintritt. So konnte die Silberkorn-Verteilung im Dunkelfeld parallel zum AO-Zellbild im Fluoreszenzlicht beobachtet werden.

Der Nachweis, daß am AO-gefärbten Präparat die Immunperoxydase-Reaktion eintritt, eröffnet die Perspektive, am AO-Schnitt auch das weite Spektrum der immunhistochemischen Methoden zum Nachweis von Neuropeptiden anzuwenden.

Aus der hier vorgestellten Kombinierbarkeit von AO ergibt sich die Möglichkeit, nach vorangegangener Analyse der Zytoarchitektonik am selben Schnitt auch die Fibro-, Myelo- oder Chemoarchitektonik zu untersuchen. Eine Korrelation der einzelnen Befunde kann dabei bis auf die Ebene der einzelnen Zelle durchgeführt werden. Dies ist z.B. für eine Untersuchung der Neuropeptidverteilung sehr wichtig, wo die sonst übliche Verwendung von Folgeschnitten eine Feinanalyse, das heißt die genaue Zuordnung einer bestimmten Zelle, nicht erlaubt.

3. Instrumentelle Bedingungen

Um eine konstante Auswertung der Präparate zu gewährleisten, mußten neben den histologischen auch die meßtechnischen Bedingungen konstant gehalten werden.

Durch Anwendung einer stabilisierten Quecksilberhochdruckdampflampe konnten die Schwankungen der Anregungsintensität in sehr geringen Grenzen gehalten werden. Die Größe des Lichtkegels (Durchmesser 80 µm) und damit das Anregungsfeld, das Objektiv, die Anregungs- und Sperrfilter sowie die Meßfeldblenden wurden als instrumentelle Voraussetzungen konstant gehalten. Die Fokussierung konnte während des genannten Meßvorgangs durch einen Beobachter kontrolliert werden.

Unter unseren Meßbedingungen lag die Vorbeleuchtungszeit konstant bei 12 sec. für jedes Meßfeld. Der Fluoreszenzwert betrug dabei noch 94% des Ausgangswertes. Da alle Einstellungen (Fokussierung, Justierung und Orientierung) im Durchlicht erfolgten, war von daher ein zusätzliches Ausbleichen ausgeschlossen. Die Anregungsbedingungen können daher als konstant und das Ausbleichverhalten als kalkulierbar bezeichnet werden. Dieses entspricht den Beobachtungen von SANDRITTER und KRUG (1982), die den Ausbleichfehler bei Verwendung automatischer "Scanning"-Systeme wegen der konstanten Anregungsbedingungen negieren.

4. Morphometrie und Stereologie

Grundlagen

Die mikroskopische Bestimmung von Stoffmengen wie z.B. Nukleinsäuren im Schnittpräparat kann mit Hilfe der Transmissionsphotometrie erfolgen. Man benutzt hierzu die Absorption bzw. Transmission im sichtbaren Licht nach Anfärbung der Zellen. Im Nervengewebe kommen zu diesem Zweck

Nissl-Farbstoffe zur Anwendung (CAMPBELL, 1954; RYZEN, 1956).

Da die Nukleinsäureverteilung im Schnitt relativ inhomogen ist und gefärbte Zellen im Schnitt kompliziert geformte Objekte mit inhomogener Farbverteilung sind, muß bei der Absorptionsphotometrie die Extinktion in jedem Punkt des Objektbildes gemessen und über die Objektfläche integriert werden. Die dazu notwendige Zerlegung des Bildes in viele Meßpunkte ist bei einer Auswertung von Schnitten mit einem "Scanning"-System extrem aufwendig (RUCH, 1966). Zusätzlich besteht bei der Verwendung von Farbstoffen wie CV ein weiteres Problem darin, daß keine Proportionalität zwischen der Intensität der Anfärbung und der Menge des angefärbten Stoffes besteht. Man kann also feststellen, daß bei CV-Material zu dem Nachteil des hohen Meßaufwandes die mangelnde Proportionalität zwischen Farbstoff- und Nukleinsäuremenge hinzukommt. Letzteres ist der Grund dafür, daß keine exakte und vergleichende Aussage über Nukleinsäureverteilungen in CV-Schnitten möglich ist.

Bei den hier vorgenommenen Absorptionsmessungen an Einzelzellen im Schnitt (Zytophotometrie) wurde den Anforderungen einer hohen Objektauflösung mit einer Schrittweite von 2 µm weitgehend entsprochen. Bei der Bestimmung der Nukleinsäureverteilung innerhalb des 1000 µm x 1000 µm großen Meßfeldes in der ASC (Histophotometrie) wurde mit einer Schrittweite von 10 µm eine Auflösung gewählt, die zu gering war, die inhomogene Kernsäureverteilung exakt zu erfassen. Mit einer Schrittweite von 2 µm wäre der Zeitaufwand um den Faktor 25 gestiegen, so daß bei der Absorptionsphotometrie 50 Stunden Meßzeit pro Schnitt nötig gewesen wären. Ein solcher Aufwand erschien angesichts des Fehlers durch die nicht proportionale Beziehung zwischen Farbwert und Stoffmenge nicht gerechtfertigt. Die unter diesen Bedingungen durchgeführten Messungen

ergaben nur mit Einschränkungen verwertbare Ergebnisse, da neben der mangelhaften Auflösung bei der Histophotometrie zwischen Photometerwert und zugrunde liegender Nukleinsäuremenge keine streng proportionale, sondern nur eine, mathematisch betrachtet, monotone Beziehung besteht.

Die Bestimmung von Stoffmengen mit inhomogener Verteilung in Schnitten gestaltet sich einfacher, wenn an Stelle der Lichtabsorption eine Lichtemission wie die Fluoreszenz verwendet wird. Hier ist die von einem Objekt ausgestrahlte Lichtmenge unter geeigneten Bedingungen proportional zur Stoffmenge, so daß die Verteilung des Stoffes keine Rolle mehr spielt (RUCH, 1966). Bei AO ist aufgrund der histochemischen Mechanismen eine Proportionalität zwischen gebundener Farbstoffmenge und Nukleinsäuren anzunehmen (RIGLER, 1966; GOLDEN und WEST, 1974). Zwischen dem Photometerwert und der Nukleinsäuremenge besteht nun ebenfalls eine proportionale Beziehung. Da außerdem die Lichtmenge bei der Messung der AO-Fluoreszenz direkt über dem Meßareal integriert wird, ist eine so hohe Auflösung im "Scanning"-System wie bei der Absorptionsphotometrie nicht erforderlich. Bei einem Schnitt durch die ASC war also selbst bei einer Schrittweite von 10 µm immer noch eine exakte Nukleinsäuremessung möglich bei einem mit 2 Stunden vertretbaren Zeitaufwand.

Morphometrische Befunde und stereologische Darstellungen in der ASC

Nach den vorangeschickten prinzipiellen Erwägungen ergibt sich die Brauchbarkeit der Fluoreszenz, und in diesem speziellen Falle von AO, für quantitative Histophotometrie. In dieser Arbeit konnte die Eignung des AO-Färbeverfahrens für eine automatische morphometrische Analyse der Zytoarchitektonik von Hirnschnittmaterial gezeigt werden. Dieses konnte am Beispiel der Atrophievorgänge in der ASC einer einseitig enukleierten Ratte dargestellt werden.

Die vor einer weiteren Auswertung als erster Schritt der Morphometrie notwendige Abgrenzung von Strukturen innerhalb der ASC (insbesondere Nuclei suprachiasmatici, piale Oberfläche und III. Ventrikel) erfolgte mit Isolinien. Die Schwellen dieser Linien wurden nach dem Verfahren von MENDELSOHN, KOLMAN und BOSTROM (1964) aus einer Analyse von Histogrammen der Meßwertverteilung gewonnen. Dabei zeigte sich, daß die Schwankungen der Meßwertverteilungen zwischen den einzelnen AO-Schnitten so gering waren, daß die einmal ermittelten Schwellenwerte für die verschiedenen histologischen Strukturen in der gesamten AO-Serie beibehalten werden konnten.

Damit war die Analyse der AO-Schnitte einer Analyse von CV-Schnitten eindeutig überlegen. Bei Nissl-Material mußten die Schwellen der Isolinien für jeden Schnitt neu bestimmt werden, da die Meßwertverteilung erheblichen Schwankungen unterlag. So bewegte sich der Schwellenwert für die äußere Begrenzung des SCN um $\pm$ 25% um einen Mittelwert von 785. Diese Schwankungen dürften ihre Ursache in der Inkonstanz der CV-Färbung und der daraus resultierenden von Schnitt zu Schnitt jeweils unterschiedlichen Tingierung haben (ADHAMI, 1973).

Nach RUCH und BOSSHARDT (1963) liefert die Fluoreszenzphotometrie unter den oben angegebenen Bedingungen der Proportionalität zwischen Fluorochrom und Substanzmenge relative Werte dieser Stoffmengen. Nur wenn absolute Werte verlangt werden, ist zusätzlich der Vergleich mit einem Standardobjekt nötig. Es ist also auch ohne Verwendung eines Standardobjektes der in dieser Arbeit beabsichtigte Vergleich des Nukleinsäuregehaltes verschiedener Strukturen, insbesondere des SCN_{ext} und SCN_{int}, innerhalb eines Schnittes oder mehrerer möglich.

Sowohl die AO- als auch die Nissl-Methode erlaubte also, eine genaue Abgrenzung auch komplexer histologischer Struk-

turen vorzunehmen. Mit den hier gewählten Isolinien ließ sich beispielsweise die äußere Begrenzung des SCN genau festlegen. Mit den herkömmlichen histologischen Verfahren dagegen ist eine genaue Abgrenzung des SCN von der ASC im dorso-lateralen Bereich, aufgrund seines relativ diffusen Übergangs in den lateralen Hypothalamus, sehr schwer (MAI, 1978b; VAN DEN POL, 1980). Ansätze zu einer Lösung dieser Problematik mit morphometrischen Methoden finden sich bei VAN DEN POL (1980) und PALKOVITS und FISCHER (1968). Nur die AO-Methode erlaubte jedoch, neben der Abgrenzung der Zytoarchitektonik auch einen genauen Vergleich des Nukleinsäuregehaltes verschiedener Strukturen vorzunehmen. Bei CV-Material dagegen können Relationen des Kernsäuregehaltes nicht angegeben werden.

Nach vorangegangener Abgrenzung innerhalb der Area suprachiasmatica konnten weitergehende morphometrische Analysen durchgeführt werden. Als ein Beispiel wurde AO-Schnittmaterial einer bei der Geburt einseitig enukleierten Ratte gewählt. Ein hier durchgeführter intraindividueller Vergleich der Nuclei suprachiasmatici zeigte, daß, bei mit 615 µm gleicher Länge der beiden Kerne, auf der zur Enukleation contralateralen Seite sowohl die ventro-dorsale (240 µm gegenüber 330 µm ipsilateral) als auch die mediodorsale Ausdehnung (330 µm gegenüber 360 µm ipsilateral) geringer waren als auf der ipsilateralen. Eine Gegenüberstellung der Kernvolumina ergab, daß der SCN_{ext} auf der zur Enukleation contralateralen Seite (0,015 mm^3) um 30% kleiner war als der ipsilateral gelegene SCN_{ext} (0,022 mm^3). Die Volumina der SCN_{int} waren mit 0,0043 mm^3 auf der ipsilateralen und 0,0045 mm^3 auf der contralateralen Seite annähernd gleich groß. Nach den hier referierten Ergebnissen liegt es nahe, eine Atrophie des contralateral zur Enukleation gelegenen Kernes (SCN_{ext}) anzunehmen. Der innere Kernanteil (SCN_{int}) scheint jedoch nicht in die Atrophie-

vorgänge miteinbezogen zu sein. Die beobachtete Atrophie korrespondiert zu den Ergebnissen von PATE (1937), der an von ihm untersuchten Hirnen einseitig enukleierter Katzen ebenfalls eine Atrophie des contralateral zur Enukleation gelegenen Kernes beschrieb. Daneben fand dieser Autor auch eine Schrumpfung der einzelnen Zellkerne im atrophierten SCN. WENISCH (1976) gibt in seinen karyometrischen Studien einseitig enukleierter Ratten ebenfalls eine Abnahme des Zelldurchmessers, und zwar von 11,3%, auf der zur Enukleation contralateralen Seite an. Angaben über ein Verhalten der Gesamtkonfiguration des SCN werden nicht gemacht. STANFIELD und COWAN (1976) dagegen fanden bei den von ihnen untersuchten Ratten keinerlei Veränderung von Lage, Größe und Konfiguration des SCN. Auch die Zellgrößen waren auf beiden Seiten gleich. In Anbetracht dieser stark differierenden Beobachtungen sollte die bei dem hier untersuchten Tier gefundene Atrophie in Hinblick auf eine Allgemeingültigkeit mit Vorsicht interpretiert werden.

An CV-gefärbten Hirnschnitten eines erwachsenen Normaltieres durchgeführte Messungen ergaben auf beiden Seiten gleiche anterior-posteriore (650 µm bds.), ventro-dorsale (315 µm bds.) und medio-laterale (330 µm bds.) Ausdehnungen. Die Abweichungen der Kernvolumina waren sowohl beim SCN_{ext} (0,025 mm^3 rechts gegenüber 0,022 mm^3 links) als auch beim SCN_{int} (0,005 mm^3 rechts gegenüber 0,0045 mm^3 links) mit jeweils rund 10% relativ gering. GÜLDNER (1976) gibt für die von ihm untersuchten Ratten für den SCN eine Länge von 600 µm, eine ventro-dorsale Ausdehnung von 350 µm und eine medio-laterale von 300 µm an. Das Gesamtkernvolumen für beide Nuclei suprachiasmatici zusammen betrug 0,05 mm^3. Auch MASON und LINCOLN (1976) untersuchten unbehandelte Tiere und fanden eine Kernlänge von 650 um und einen Kerndurchmesser von 250 µm. VAN DEN POL (1980) macht zu einer Ausdehnung des SCN folgende Angaben: Kernlänge 947 $\pm$ 56 µm,

ventro-dorsale Ausdehnung 390 ± 25 µm und medio-laterale Ausdehnung 424 ± 18 µm. Das von ihm ermittelte Kernvolumen betrug 0,068 ± 0,008 mm^3 für einen SCN. Die hier gefundenen Maße für den SCN entsprechen also ziemlich genau den Angaben von GÜLDNER (1976) sowie MASON und LINCOLN (1976). Sowohl die Ergebnisse dieser Autoren als auch die hier gemachten Beobachtungen unterscheiden sich aber ganz erheblich von den Angaben VAN DEN POLs (1980), der um rund 30% größere Kerndurchmesser und ein fast dreimal so großes Kernvolumen angibt. Eine ganz entscheidende Ursache für diese Differenzen dürfte in der schwierigen Abgrenzung des SCN im anterioren und dorso-lateralen Bereich (MAI, 1976; VAN DEN POL, 1980) liegen. Die hier beschriebene Methode für eine Auswahl der Isolinien stellt einen ersten Schritt auf dem Wege zu einer reproduzierbaren Abgrenzung dar.

Ein Vergleich der Daten des enukleierten Tieres mit denen des Normaltieres ist wegen der unterschiedlichen Analysemethoden (AO-Fluoreszenz gegenüber CV-Absorption) und der unterschiedlichen Überlebenszeiten der Tiere (enukleiertes Tier 27 Wochen, Normaltier 54 Wochen) sehr schwierig. Es ist jedoch auffällig, daß bei der enukleierten Ratte der SCN auf der zur Enukleation contralateralen Seite um mehr als 30% kleiner ist als der Kern der anderen Seite. Bei dem Normaltier dagegen betrugen die Abweichungen der Kernvolumina nur ca. 10%. Interessant ist weiterhin, daß die Kernvolumina des Normaltieres und die Volumina der zur Enukleation ipsilateralen Seite des operierten Tieres (Normaltier: SCN_{ext} re. 0,025 mm^3, SCN_{ext} li. 0,022 mm^3; enukleiertes Tier: SCN_{ext} ipsilateral 0,022 mm^3 - Normaltier: SCN_{int} ipsilateral 0,0043 mm^3) nur sehr geringfügig voneinander abweichen, wohingegen das Volumen des contralateral zur Enukleation gelegenen SCN_{ext} des operierten Tieres (0,015 mm^3) deutlich kleiner ist. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen dürfte es also, ähnlich wie bei PATE (1937) und WENISCH (1976), nach Enukleation zu Atrophievorgängen im SCN gekommen sein.

Gestützt auf eine im Rahmen einer morphometrischen Analyse durchgeführte Abgrenzung histologischer Strukturen innerhalb der ASC gelang es, eine dreidimensionale Rekonstruktion dieser Region und der darin enthaltenen Strukturen (SCN_{ext}, SCN_{int}, III. Ventrikel, piale Oberfläche) vorzunehmen. Dabei diente eine Darstellung der Zytoarchitektonik als Basis für ein gesamt-architektonisches Modell. Dieses sollte auch den Einbau weiterer histologischer und histochemischer Parameter erlauben.

Am Beispiel einer Rekonstruktion von CV-gefärbten Schnitten eines Normaltieres konnte gezeigt werden, daß sich in das Modell der Zytoarchitektonik zusätzliche Untersuchungen über die Faseranatomie integrieren lassen. Dabei stellte sich heraus, daß die inneren Anteile des SCN (SCN_{int}) von der Mehrheit der retinalen Afferenzen nicht erreicht werden, sondern daß diese fast ausschließlich im SCN_{ext} enden. Es gibt lediglich einige kleine inselförmige Areale im Bereich des SCN_{int}, wo die Abgrenzungslinien des Kerns von denen der Fasern überlagert werden. Dieses bestätigt die Beobachtungen von MAI (1976), der angab, daß eine ventrolateral gelegene zellarme Zone des SCN das Zielgebiet retinaler Faserprojektionen darstellt, wohingegen die mehr medial gelegenen Kernanteile frei bleiben von afferenten Fasern. Gleichzeitig könnte diese unterschiedliche Verteilung der retinalen Afferenzen die oben beschriebenen nach Enukleation eintretenden Atrophievorgänge erklären. Wie bereits geschildert, trat eine Atrophie allein im SCN_{ext} auf, also in dem Kernbereich, in dem beim Normaltier die retinalen Faserprojektionen enden.

Bei einem enukleierten und AO-gefärbten Tier wurde in die Rekonstruktion der ASC die Darstellung einer Gruppe von Nervenzellen aufgenommen, die zwischen den beiden Nuclei suprachiasmatici und unterhalb des III. Ventrikels lag. Diese Nervenzellgruppe erschien deshalb so interessant,

weil ihre Lage zwischen den beiden SCN und die Orientierung eines großen Teils ihrer Neurone in der Frontalebene eine funktionelle Bedeutung dieser Gruppe für die Verbindung der beiden Nuclei suprachiasmatici vermuten läßt. So findet sich bei MOORE, CARD und RILEY (1980) der Hinweis, daß bei Golgi-Studien eine besondere Zellgruppe im Bereich des Chiasma opticums gefunden wurde, deren Dendriten in beide SCN projizieren. LYDIC, ALBERS, TEPPER und MOORE-EDE (1981) leiten aus dieser anatomischen Verbindung eine funktionelle Kopplung der beiden SCN her. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß auch VAN DEN POL (1980) bei Untersuchungen mit Golgi-Imprägnation und mit der HRP-Technik Axone nachwies, die sich von einem SCN bis in den gegenseitigen Kern verfolgen ließen.

Versuche einer dreidimensionalen Rekonstruktion von hypothalamischen Strukturen wurden von FISHER, PRICE, BURFORD und LEDERS (1979) sowie von LANGEVIN und IVERSEN (1980) unternommen.

LYDIC und MOORE-EDE (1980) sowie LYDIC et al. (1981) nahmen eine computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion des SCN vor, der eine nach Projektion der Schnitte durchgeführte subjektive, manuelle Abgrenzung zugrunde lag. In der vorliegenden Arbeit gelang es, durch entsprechenden zeitlichen und meßtechnischen Aufwand über das oben beschriebene Verfahren für eine Auswahl von Isolinien zu einer reproduzierbaren, objektiven Abgrenzung des SCN zu kommen. Die hier gezeigten Repräsentationen dürften also ziemlich exakt der Konfiguration des SCN entsprechen.

Gerade die ASC mit dem SCN ist wegen ihrer regionalen Komplexität für eine stereologische Darstellung von großem Interesse (MAI, KRAUTHAUSEN, TECKHAUS, SCHMIDT-KASTNER und TEFETT, 1981).

Insbesondere aus dieser Region liegen eine ganze Reihe von

Daten über die Verteilung von Neuropeptiden vor. So wiesen VANDESANDE, DE MEY und DIERICKX (1974) Neurophysin, VANDESANDE, DIERICKX und DE MEY (1975) Vasopressin, SIMANTOW, KUHAR, UHL und SNYDER (1977) sowie WAMSLEY, YOUNG und KUHAR (1980) Enkephaline und DIERICKX und VANDESANDE (1979) Somatostatin nach. Auch über die regionale Verteilung dieser Peptide im SCN liegen Ergebnisse vor. SOFRONIEW und WEINDL (1978) beschrieben, daß Vasopressin- und Neurophysin-enthaltende Neurone im dorsalen und rostralen Bereich des SCN konzentriert waren. Für Somatostatin geben DIERICKX und VANDESANDE (1979) den dorsalen und medialen Anteil des SCN als Hauptlokalisation an.

Wie bereits oben diskutiert, eröffnet die AO-Methode die Möglichkeit, Kombinationen verschiedener histologischer Techniken am selben Schnitt vorzunehmen. Gerade für eine Analyse der Chemoarchitektonik ist eine solche Kombination, aber auch eine Kombination verschiedener Neuropeptiddarstellungen wünschenswert, da nur auf diese Weise eine Feinanalyse der Neuropeptidverteilung möglich ist.

Das gezeigte stereologische Modell, das eine Integration der verschiedenen architektonischen Befunde und der Neuropeptiddarstellungen erlaubt, könnte dann weiterhelfen, physiologische Zusammenhänge und die Rolle des SCN weiter zu klären.

5. Ausblick

Die Eignung der AO-Färbung für die Auswertung mit einem automatischen Bildanalysesystem (I.B.A.S.) konnte gezeigt werden. Dazu wurden verschiedene Hirnareale auf ihre Grauwertverteilung untersucht. In der ASC hatten die aus dieser Analyse resultierenden Verteilungshistogramme zwei klar voneinander abgrenzbare Gipfel. Der erste entsprach dabei dem des Neuropils, der zweite Gipfel deckte sich mit dem

für Nervenzellen typischen. Bei Nissl-Material dagegen fand sich in der ASC eine relativ kontinuierliche Grauwertverteilung mit nur einem Gipfel, ein zweiter, der, wie bei AO, Nervenzellen charakterisierte, war nicht vorhanden.

Nach diesen vorläufigen Ergebnissen mit dem I.B.A.S. zeichnet sich ab, daß sich auch aus der Videobildanalyse von AO-Schnitten ein an Lage und Höhe der Verteilungsgipfel orientiertes Verfahren zur automatischen Abgrenzung und Messung von Nervenzelldichten entwickeln läßt.

Weitere Untersuchungen an der Area septi der Ratte zeigen, daß im AO-Präparat eine automatische Zellzählung möglich ist. Die Anzahl der Nervenzellen in diesem Bereich konnte dabei mit einer Genauigkeit von 5,6% im Vergleich zu einer visuellen morphometrischen Auswertung bestimmt werden (KRAUTHAUSEN, MAI und BREDAHL, 1982).

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Brauchbarkeit von Fluoreszenzfärbungen für eine automatische, photometrische Analyse der Zytoarchitektonik am Hirnschnitt untersucht.

Die klassische Nissl-Färbung mit Cresyl-Violett (CV) diente als Vergleich. Die Beurteilung der Färbeergebnisse wurde anhand der fünf Kriterien Konstanz (1), Reproduzierbarkeit (2), Spezifität (3), Kontrast (4) und Kombinierbarkeit mit anderen histologischen Methoden (5) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die aus der Zytophotometrie an Einzelzellen bekannten Vorteile der Fluoreszenzmethoden auch für eine Auswertung von Schnittpräparaten genutzt werden konnten. Als am besten geeignet erwies sich das Fluorochrom Acridin-Orange (AO) in folgendem Verfahren: Färbung 5 µm-dicker Formalinfixierter Paraffinschnitte in einer wässrigen AO-Lösung der Verdünnung 1:50 000 bei einem pH von 1,2 für 30 min., mit

abschließender Wässerung von 2x5 min.. Bei dieser Methode resultierte ein mehrfarbiges Zellbild, das neben der auch im guten CV-Bild möglichen Differenzierung zwischen Zytoplasma, Kern und Nukleolus über den unterschiedlichen Farbwert verschiedener Zelltypen (z.B. Nervenzellen und Gliazellen) weitergehende Analysen erlaubte. Zytophotometrische Messung am AO-gefärbten Schnittpräparat ergab gute Konstanz (1) und Reproduzierbarkeit (2) sowie hohe Kontraste (4). Bei den untersuchten Schnitten stellten sich nahezu ausschließlich die nukleinsäurehaltigen Strukturen Zytoplasma, Kern und Nukleolus dar, so daß für dieses Färbeverfahren eine hohe Spezifität (3) anzunehmen ist. Da außerdem die AO-Färbung nicht zerstörend auf den Schnitt wirkt, sind somit unbesetzte Bindungsstellen frei für nachfolgende histochemische Reaktionen.

Unter dem Aspekt der Kombinierbarkeit (5) ist auch das den Fluoreszenzfarbstoffen eigene Ausbleichverhalten für eine Nachfärbung des AO-Präparates mit anderen Fluorochromen nutzbar. Im Vergleich zu AO erwiesen sich die weiteren untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe (Pararosanilin und BAO im Feulgen-Verfahren) und die CV-Färbung als weniger geeignet.

Die quantitative Beziehung von AO zu Nukleinsäuren wurde bei der Analyse AO-gefärbter Schnitte dahingehend ausgenutzt, daß aus den gewonnenen Photometerdaten durch Computerbearbeitung Abgrenzungslinien für die Zytoarchitektonik ermittelt wurden. Anhand dieser Linien war eine objektive und reproduzierbare Abgrenzung der Strukturen innerhalb der Area suprachiasmatica (ASC) mit weiterer morphometrischer Analyse möglich. Beim Nucleus suprachiasmaticus (SCN), den man in eine äußere Zellkondensation (SCN_{ext}) und eine innere (SCN_{int}) unterteilen konnte, wurden Länge, Breite, Höhe und Volumen beider Kernanteile bestimmt. Dabei zeigte sich bei einer einseitig enukleierten Ratte nur auf der contralateral zur Enukleation gelegenen Seite eine Atrophie,

die auf den SCN_{ext} beschränkt war, wohingegen der SCN_{int} unverändert erschien.

Desweiteren wurden die ermittelten Abgrenzungslinien für eine dreidimensionale Rekonstruktion der ASC verwendet. In diese stereologische Darstellung wurden weitere histologische Parameter (autoradiographische Markierungsfelder und besonders kodierte Einzelzellen) integriert. Hierbei wurde deutlich, daß die autoradiographisch markierten retinalen Afferenzen fast ausschließlich im SCN_{ext} enden.

Eine Grauwertanalyse mit dem I.B.A.S. zeigte die Brauchbarkeit der AO-Methode für die Verwendung in einem Videobildsystem. Die gewonnenen Histogramme der Grauwertverteilung ließen erkennen, daß sich ein an Lage und Höhe der Verteilungsgipfel orientiertes Verfahren zur automatischen Messung von Nervenzelldichten entwickeln läßt.

LITERATUR

Adhami, H.: Die photometrische Bestimmung des Cortexzell- und Graugehaltes auf der Grundlage des Nissl-Bildes. Acta Anat. Suppl. 60 1 (1973).

Armstrong, J.A. and Niven, J.S.: Histochemical observations on cellular and virus nucleic acids. Nature 130 1335 (1957).

Arnold, M.: Histochemie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1968).

Bauer, H.: Die Feulgensche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. Z.Zellforsch. u. Mikrosk. Anat. 15 225 (1932).

Bauer, K.D. and Dethlefsen, L.A.: Total cellular RNA content. Correlation between flow cytophotometry and ultraviolet spectroscopy. J.Histochem.Cytochem. 28 493 (1980).

Bertalanffy, F.v.: Evaluation of the acridine-orange fluorescence microscope method for the cytodiagnosis of cancer. Ann.NY.Acad.Sci. 93 717 (1962).

Bertalanffy, L.v. and Bickis, I.: Identification of cytoplasmatic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. J.Histochem.Cytochem. 4 481 (1956).

Böhm, N.: Fluorescent cytomorphometric determination of DNA. In: Techniques of biochemical and biophysical morphology, Vol.1. Ed.D.Glick and R.M.Rosebaum. Wiley Interscience, New York 8 (1972).

Böhm, N. and Sprenger, E.: Fluorescence cytophotometry: a valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen DNA. Histochemistry 16 100 (1968).

Bukatsch, F. und Haitinger, M.: Beiträge zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhalts insbesondere des Cytoplasmas und des Zellkerns. Protoplasma 34 515 (1940).

Campbell, B.: The organization of the cerebral cortex. I. Introduction and methodology. J.of Neuropath.13 407 (1954).

Conn, H.J.: Biological stains. A handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory. 7.Ed. Baltimore, Maryland (1961).

Cowden, R.R. and Curtis, S.K.: Some quantitative aspects of acridineorange fluorescence in unfixed, sucrose-isolated mammalian nuclei. Histochem.J. 8 45 (1976).

Dierickx, K. and Vandesande, F.: Immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. Cell.Tiss.Res. 201 349 (1979).

Dutt, M.K.: Acridine orange-its use in the specific staining of DNA in mammalian tissue sections. Microsc.Acta 84 37 (1981).

Eins, S. und Gallyas, F.: Selektive und kontrastreiche Färbungen im Hirngewebe. Microsc.Acta Suppl. 1 157 (1977).

Exner, R.: Fortschritte in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Großhirnrinde. Psychiatr.Neurol.Wschr. 42 361 (1940).

Fischmeister, H.F.: Apparative Hilfsmittel der Stereologie. In: Quantitative Methoden in der Morphologie. Hrsg. E.R. Weibel, H. Elias. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 221 (1967).

Fisher, A.W.F., Price, P.G., Burford, G.D. and Leders, K.: A 3-dimensional reconstruction of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. Cell.Tiss.Res. 204 343 (1979).

Franke, H. (Hrsg.): Lexikon der Physik, Bd.2. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart (1969).

Gabe, M.: Histological Techniques. Masson/Springer (1976).

Gössner, W.: Zur Histochemie des Strugger-Effekts. Verh. Dtsch.Path.Ges. 33 102 (1949).

Golden, J.F. and West, S.S.: Fluorescence spectroscopic and fading behavior of Ehrlich's hyperdiploid mouse ascites tumour cells supravitally stained with acridine orange. J.Histochem.Cytochem. 22 495 (1974).

Graumann, W.: Zur Standardisierung des Schiffschen Reagens. Z.Wiss.Mikr. 61 225 (1953).

Güldner, F.-H.: Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. Cell.Tiss.Res. 165 509 (1976).

Haag, D., Tschahargane, G. und Goerttler, K.: Über die Eignung von Ethidiumbromid als Fluorochrom zur quantitativen Darstellung von Nukleinsäuren in histologischen Präparaten. Histochemie 27 119 (1971).

Haug, H.: Stereological methods in the analysis of neuronal parameters in the central nervous system. J.Microsc. 95 165 (1972).

Hicks, J.D. and Matthaei, E.: Fluorescence in histology. J.Path.Bact. 70 1 (1955).

Kasten, F.H.: Schiff-type reagents in cytochemistry. 1. Theoretical and practical considerations. Histochemie 1 466 (1959).

Kater, S.B. and Nicholson, C.: Intracellular staining in Neurobiology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1973).

Kiernan, J.A. and Berry, M.: Neuroanatomical Methods. In: Methods in brain research, Ed.P.B.Bradley. John Wiley & Sons, London 3 (1975).

Koch, K.-F.: Fluoreszenzmikroskopie-Instrumente, Methoden, Anwendung. Leitz (1972).

Krauthausen, I., Mai, J.K. und Bredahl, B.: Quantitative Cytomorphologie: Vergleich manueller und interaktiv automatischer Methodik. Verh.Anat.Ges. (in Druck), 1982.

Krieg, A.: Fluoreszenzanalyse und Fluorochromie in Biologie und Medizin. Klin.Wschr. 31 350 (1953).

Kuhlenbeck, H.: The central nervous system of vertebrates, Vol.3, Part I: Structural elements, biology of nervous tissue. S. Karger, Basel (1970).

Langevin, H. and Iversen, L.L.: A new method for the microdissection of the human hypthalamus, with mapping of cholinergic, GABA and catecholamine systems in twelve nuclei and areas. Brain 103 623 (1980).

Lerman, L.S.: Structural consideration in the interaction of DNA and acridines. J.Mol.Biol. 3 18 (1961).

Loeser, C.N., West, S.S. and Schoenberg, M.D.: Absorption and fluorescence studies on biological systems: nucleic acid-dye complexes. Anat.Rec. 138 163 (1960).

Lydic, R. and Moore-Ede, M.C.: Three-dimensional structure of the suprachiasmatic nuclei in the diurnal squirrel monkey (Saimiri sciureus). Neurosci.Lett. 17 295 (1980).

Lydic, R., Albers, H.E., Tepper, B. and Moore-Ede, M.C.: Three-dimensional structure of the mammalian suprachiasmatic nuclei: a comparative study of five species. In Druck (1981).

Mai, J.K.: Quantitative autoradiographische Untersuchungen am subcorticalen System der Albinoratte. Dissertation, Düsseldorf (1976).

Mai, J.K.: Ein automatisiertes System zur quantitativen Analyse von Autoradiogrammen. In: Aktuelle Probleme der Neuropathologie, Hrsg. K. Jellinger und H. Gross, Wien 7 (1978a).

Mai, J.K.: The accessory optic system and the retino-hypothalamic system. A review. J. Hirnforsch. 19 213 (1978b).

Mai, J.K., Krauthausen, I., Teckhaus, L., Schmidt-Kastner, R. and Tefett, H.-B.: Stereological evaluation of histological and histochemical properties within the suprachiasmatic area (ASC) of the rat (abstract). Neurosci.Lett.Suppl. 7 231 (1981).

Mannen, H.: Contribution to the quantitative study of the nervous tissue. A new method for the measurement of the volume and surface of neurons. J.Comp.Neurol. 126 75 (1966).

Mason, C.A. and Lincoln, D.W.: Visualization of the retino-hypothalamic projection by cobalt precipitation. Cell. Tiss.Res. 168 117 (1976).

Matzke, K.H., Thiessen, G. and Tiffe, H.W.: The evaluation of cell nuclei staining parameters regarding the reproducibility of fluorescence measurements. J.Microsc. 116 391 (1979).

Mendelsohn, M.L., Kolman, W.A. and Bostrom, R.C.: Initial approaches to the computer analysis of cytophotometric fields. Ann.NY.Acad.Sci. 115 998 (1964).

Moore, R.Y., Card, J.P. and Riley, J.N.: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus: neuronal ultrastructure (abstract). Proc.Soc.Neurosci. 6 758 (1980).

Nicolini, C., Belmont, A., Parodi, S., Lessin, S. and Abraham, S.: Mass action and acridine orange staining: static and flow cytofluorometry. J.Histochem.Cytochem. 27 102 (1979).

Nissl, F.: zitiert nach Kuhlenbeck, H. (1970).

Palkovits, M. and Fischer, J.: Karyometric investigations. Akadémiai Kiadó, Budapest (1968).

Pate, J.R.: Transneuronal atrophy of the nucleus ovoideus following eye removal in cats. Anat.Rec. 67, Suppl.39 p.39 (1937).

Pearse, A.G.E.: Histochemistry theoretical and applied, 2.Ed. Little and Brown, Boston (1960).

Pearse, A.G.E.: Histochemistry theoretical and applied, 3.Ed. Little and Brown, Boston (1972).

Ploem, J.S., de Sterke, J.A., Bonnet, J. and Wasmud, H.: A micro-spectrofluorometer with epi-illumination operated under computer control. J.Histochem.Cytochem. 22 668 (1974).

Pritchard, N.J., Blake, A. and Peacocke, A.R.: Modified intercalation model for the interaction of amino acridines and DNA. Nature 212 1360 (1966).

Rigler, R.Jr.: Microfluorometric characterization of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine-orange. Acta Physiol.Scand. 67 Suppl. 267 (1967).

Romeis, B.: Mikroskopische Technik. R. Oldenbourg Verlag, München, Wien (1968).

Ruch, F. und Bosshard, U.: Photometrische Bestimmung von Stoffmengen im Fluoreszenzmikroskop. Z.Wiss.Mikr. 65 335 (1963).

Ruch, F.: Determination of DNA content by microfluorometry. In: Introduction to quantitative cytochemistry Vol. I.Ed. G.L.Wied. Academic Press, New York, London 281 (1966).

Ruch, F.: Principles and some applications of cytofluorometry. In: Introduction to quantitative cytochemistry Vol.II. Ed. G.L. Wied. Academic Press, New York, London 431 (1970).

Ryzen, M.: A microphotometric method of cell enumeration within the cerebral cortex of man. J.Comp.Neurol. 104 233 (1956).

Sandritter, W., Kiefer, G. und Rick, W.: Über die Stöchiometrie von Gallocyanin-Chromalaun mit Desoxyribonucleinsäure. Histochemie 3 315 (1963).

Sandritter, W. und Krug, H.: Absorptions- und Fluoreszenzphotometrie-Abgrenzung der Anwendungsbereiche. Acta histochem. Suppl. 26 223 (1982).

Saurer, W.: Eigenfluoreszenz von Proteinen und Nukleinsäure im Zellkern. Dissertation Nr. 3834, E.T.H. Zürich (1966).

Saurer, W.: Effect of fixation on histochemical determination of deoxyribonucleic acid in plant material. I. Feulgen spectrophotometric and fluorometric measurements. Mikroskopie 24 284 (1969).

Schipper, J., Tilders, F.J.H. and Ploem, J.S.: Microfluorometric scanning of sympathetic nerve fibers. An improved method to quantitative formaldehyde induced fluorescence of biogenic amines. J.Histochem.Cytochem. 26 1057 (1978).

Schümmelfeder, N.: Zur Morphologie und Histochemie nervöser Elemente. 1.Mitteilung. Die Fluorochromierung markhaltiger Nervenfasern mit Acridinorange. Virchows Arch. 319 294 (1950).

Schümmelfeder, N., Ebschner, K.J. und Krogh, E.: Die Grundlage der differenten Fluorochromierung von Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren mit Acridinorange. Naturwissenschaften 17 467 (1957).

Schümmelfeder, N., Krogh, E. und Ebschner, K.J.: Färbungsanalysen zur Acridinorange-Fluorochromierung, Histochemie 1 1 (1958).

Schultz, G.: Farbstoff-Tabellen. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1931).

Schultz, R.L. and Case, N.M.: A modified aldehyde perfusion technique for preventing certain artifacts in electron microscopy of the central nervous system. J.Microsc. 92 69 (1970).

Schwalbach, G.: Die quantitative Bildanalyse als Scanning-Verfahren in der histopathologischen Routinediagnostik am Beispiel chronischer Lebererkrankungen. Microsc.Acta 77 339 (1975).

Simantov, R., Kuhar, M.J., Uhl, G. and Snyder, S.H.: Opoid peptide enkephalin: Immunohistochemical mapping in the rat central nervous system. Proc.Natl.Acad.Sci. 74 2167 (1977).

Smit, G.J. and Colon, E.J.: Quantitative analysis of the cerebral cortex. I. Aselectivity of the Golgi-Cox staining technique. Brain Res. 13 485 (1969).

Sofroniew, M.V. and Weindl, A.: Projections from the parvocellular vasopressin and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei. Am.J.Anat. 153 391 (1978).

Stanfield, B. and Cowan, W.M.: Evidence for a change in the retino-hypothalamic projection in the rat following early removal of one eye. Brain Res. 104 129 (1976).

Steiner, R.F. and Beers, R.F.: Polynucleotides. I. Titration and spectrophotometric studies upon the interaction of synthetic polynucleotides with various dyes. Arch.Biochem. Biophys. 81 75 (1959).

Stockinger, L.: Über die Eigenfluoreszenz von Formol und die Fluoreszenz formolfixierter Gewebe. Anat.Anz. 98 82 (1951).

Strugger, J.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M. u.H. Schaper, Hannover (1949).

Teckhaus, L., Lübbers, D.W. and Rager, G.: A new method of three-dimensional reconstruction of complicated structures by combining an automatic and interactive computer technique. Microsc.Acta Suppl. 3 235 (1979).

Tefett, H.-B., Schmidt-Kastner, R. and Mai, J.K.: The use of acridine orange (AO) for automatic morphometric analysis of central nervous system. Neurosc.Lett.Suppl. 7 393 (1981).

Traganos, F., Daryzkiewicz, Z., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Simultaneous staining of ribonucleic and desoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. J.Histochem.Cytochem. 25 45 (1977).

Vandesande, F., DeMey, J. and Dierickx, K.: Identification of neurophysin producing cells. I. The origin of the neurophysin-like substance containing nerve fibers of the external region of the median eminence of the rat. Cell. Tiss.Res. 151 187 (1974).

Vandesande, F., Dierickx, K. and DeMey, J.: Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. Cell.Tiss.Res. 156 377 (1975).

Van den Pol, A.N.: The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. J.Comp.Neurol. 191 661 (1980).

Vogt, C. und Vogt, O.: Das Zentralnervensystem. III. In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie. Nervensystem I. Hrsg. W.v. Möllendorf. Springer, Berlin 448 (1928).

Wamsley, J.K., Young III., W.S. and Kuhar, M.J.: Immunhistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. Brain Res. 190 150 (1980).

Wenisch, H.J.: Karyometrische Untersuchungen an primären optischen und hypothalamischen Kerngebieten einseitig geblendeter Ratten. Anat.Anz. 140 202 (1976).

Zanker, V.: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate ("reversible Polymerisate") des Acridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung. Z.Phys.Chem. 199 225 (1952).

Zeiger, K., Harders, H. und Müller, W.: Über vitale Fluorochromfärbung des Nervengewebes. Z.Zellforsch. 36 62 (1951/52).

Zilles, K.J.: Ontogenesis of visual system. Adv.Anat.Embryol. Cell.Biol. 54 4 (1978).

N.N.: Wissenschaftliche Tabellen. CIBA-Geigy (1977).

Herrn Privatdozent Dr. J.K. Mai danken wir herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und sein stets förderndes Interesse.

Unser Dank gilt ebenfalls dem Leiter des C. u. O. Vogt-Instituts für Hirnforschung, Herrn Professor Dr. A. Hopf, für seine kontinuierliche Unterstützung.

Weiterhin bedanken wir uns bei Frau I. Krauthausen für ihre wertvolle Hilfe bei der Programmierung und statistischen Auswertung, bei Herrn L. Teckhaus vom Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund, für die Erstellung und Überlassung der dreidimensionalen Rekonstruktionen sowie bei allen Mitarbeitern des C. u. O. Vogt-Instituts für Hirnforschung für ihre Mithilfe.

Lebenslauf

24.7.1957	geboren als erstes Kind der Eheleute Dr. Günter und Irmhild Schmidt-Kastner, geb. Jünemann, in Wuppertal-Elberfeld
1964 - 1967	Besuch der Volksschule Donarstraße in Wuppertal
1967 - 1976	Besuch des Staatlich-Naturwissenschaftlichen, später Städtischen Gymnasiums an der Bayreuther Straße in Wuppertal
1976 - 1977	Grundwehrdienst
April 1977 - März 1982	Vorklinisches und Klinisches Studium an der Universität Düsseldorf
April 1982 - März 1983	Praktisches Jahr an den Evangelischen und Johanniter Krankenanstalten, Duisburg-Nord/Oberhausen, mit dem Wahlfach Neurologie
April 1983	Abschluß des Studiums mit der Ärztlichen Prüfung
z.Zt.	am "University Department of Anatomy and Pharmacology", Oxford, Großbritannien.

Rainald Schmidt-Kastner

Lebenslauf

6.7.1957	geboren als erstes Kind der Eheleute Hermann und Gerda Maria Tefett, geb. Nelischer, in Bottrop
1964 - 1967	Besuch der Liebfrauen-Volksschule in Bottrop
1967 - 1976	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges des Vestischen Gymnasiums in Bottrop
1976 - 1977	Wehrpflichtiger im Sanitätsdienst der Bundeswehr
April 1977 - März 1982	Vorklinisches und Klinisches Studium an der Universität Düsseldorf
April 1982 - März 1983	Praktisches Jahr an den Evangelischen und Johanniter Krankenanstalten, Duisburg-Nord/Oberhausen, mit dem Wahlfach Anästhesie und Notfallmedizin
April 1983	Studienabschluß mit der Ärztlichen Prüfung
Mai 1983	Approbation als Arzt
z.Zt.	Stabsarzt bei der Bundeswehr

Hans-Bernd Tefett

Druck: Hundt Druck GmbH, Zülpicher Str. 220, 5000 Köln 41, Tel. (0221) 444152